

Jacek Ziaja

Katowice, 19.06.2023

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej,
Naczyniowej i Transplantacyjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

Recenzja rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne lekarki Mileny Michalskiej pod tytułem: „Wpływ wewnątrznaczyniowego leczenia tętniaków aorty na zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe i ich korelacja z wybranymi parametrami stanu zapalnego i układu krzepnięcia”, której promotorem jest prof. dr hab. med. Tadeusz Grochowiecki, i która powstała w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego kierowanej przez prof. dr hab. med. Zbigniewa Gałązkę.

Charakterystyka formalna rozprawy

Do oceny otrzymałem tekst rozprawy w formacie PDF liczący 119 stron, przygotowany w sposób przyjęty dla prac doktorskich i składający się z 11 rozdziałów obejmujących wstęp, założenia i cele pracy, opis metody badawczej, materiał kliniczny, wyniki z ich analizą statystyczną, dyskusję oraz wnioski.

Osobne rozdziały stanowią piśmiennictwo (110 pozycji) oraz spisy tabel, rycin i rysunków, które ułatwiają czytelnikowi poruszanie się po tekście pracy.

Tekst pracy poprzedzają słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, informacja o finansowaniu pracy przez Warszawski Uniwersytet Medyczny w ramach projektu TIME 2 WUM, spis treści, wykaz stosowanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Na końcu pracy dołączono kopię zgody Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym na przeprowadzenie badania.

Manuskrypt w formacie PDF przygotowany został bardzo starannie, z zachowaniem jednolitości formy graficznej i liternictwa, co świadczy o przemyślanym sposobie prezentacji wyników wykonanych badań.

Charakterystyka merytoryczna

Tętniaki aorty są dosyć powszechnie występującym schorzeniem. Szacuje się, że około 5% osób w wieku 45-75 lat ma tętniaka aorty. Pośród tych chorych szczególną grupę stanowią pacjenci z tętniakiem aorty piersiowo-brzuszej.

Ze względu na ryzyko pęknięcia tętniaka, i w konsekwencji zgonu chorego spowodowanego krwotokiem, rozpoznanie tętniaka aorty stanowi podstawę do rozważenia leczenia zabiegowego. W kwalifikacji do leczenia zabiegowego bierze się pod uwagę przede wszystkim średnicę tętniaka oraz jego wzrost.

W chwili obecnej postępowaniem z wyboru przy leczeniu tętniaków aorty, w tym tętniaków piersiowo-brzusznych, jest leczenie endowaskularne.

W porównaniu do operacji klasycznej jest ono znacznie mniej obciążające chorego, który w większości przypadków obarczony jest innymi schorzeniami, jak nadciśnienie tętnicze, miażdżyca tętnic wieńcowych, domózgowych i obwodowych czy przewlekła obturacyjna choroba płuc. Są one nierzadko związane z wieloletnim paleniem tytoniu.

Pomimo licznych zalet, po leczeniu endowaskularnym również spotkamy się z pewnymi zaburzeniami, które mogą prowadzić do wystąpienia powikłań pooperacyjnych i wydłużać czas hospitalizacji i rekonwalescencji.

Do powikłań tych należy wystąpienie zespołu poimplantacyjnego, który charakteryzuje się zespołem objawów oraz wzrostem wartości niektórych parametrów laboratoryjnych odzwierciedlających nasilenie stanu zapalnego.

Pełne zrozumienie mechanizmów niekorzystnych zmian zachodzących u chorego po leczeniu endowaskularnym tętniaka aorty stworzyłoby szansę na włączenie odpowiedniej profilaktyki i leczenia farmakologicznego, a tym samym uniknięcia wspomnianych wcześniej powikłań. Wobec powyższych faktów badania lekarki Mileny Michalskiej dotyczące wpływu wewnątrznaczyniowego leczenia tętniaków aorty na zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe i ich korelacja z wybranymi parametrami stanu zapalnego i układu krzepnięcia są niezwykle istotne zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i klinicznego.

Wstęp swojej pracy doktorantka rozpoczęła od krótkiego zarysu całego projektu badawczego, a następnie przeszła do przedstawienia anatomii aorty, budowy jej ściany oraz fizjologii. Doktorantka przypomniała definicję tętniaka oraz podział tętniaków aorty piersiowo-brzuszej. Kolejno szczegółowo opisała patogenezę tętniaków aorty ze szczególnym uwzględnieniem roli neutrofilii oraz nowo odkrytego mechanizmu jakim jest wyrzut sieci neutrofilowych (NETs) poza komórkę neutrofila. Doktorantka zwróciła uwagę na związek pomiędzy neutrofilami i sieciami neutrofilowymi a stanem zapalnym oraz na rolę stanu zapalnego w patogenezie tętniaków aorty, a w szczególności na jego udział w inicjacji, rozwoju i progresji tętniaków poprzez wpływ na strukturalne i funkcjonalne zmiany w ścianie aorty. Doktorantka podkreśliła, że stan zapalny u chorych z tętniakiem aorty współwystępuje z zaburzeniami hemostazy, miażdżycą tętnic oraz uszkodzeniem mięśni gładkich naczyń. Ponadto doktorantka przeanalizowała udział skrzepliny wysypującej w świetle naczyń w rozwoju tętniaka oraz jej wpływ na zmiany strukturalne ściany aorty. Wstęp kończy zarysowaniem zmian, do których dochodzi u chorych z tętniakiem aorty po leczeniu endowaskularnym ze szczególnym uwzględnieniem opisu zespołu poimplantacyjnego.

Cały wstęp pracy jest spójny, przejrzysty, kompletny i bardzo dobrze uzasadniony merytorycznie, co stanowi jego ogromną wartość, a jednocześnie pozwala zrozumieć czytelnikowi zagadnienia stanowiące postawę pracy badawczej.

Założenia pracy zostały przedstawione zaledwie w jednym zdaniu i ten element rozprawy w publikacji powinien być opisany bardziej obszernie, stanowiąc przejście od bardzo dobrze napisanego wstępu pracy do jej celów.

W swojej pracy badawczej doktorantka postawiła następująco **cele**:

1. Ocenę stężeń markerów NETs przed oraz po operacji wewnątrznacyniowej tętniaków aorty piersiowo-brzuszej,
2. Ocena stężenie jednoniciowego DNA jako markera NETs,
3. Ocena ryzyka zgonu i hospitalizacji pacjentów z tętniakiem aorty piersiowo-brzuszej poddanych operacji wewnątrznacyniowej a aktywnością formowania NETs i wybranymi badaniami laboratoryjnymi.

Przeprowadzone badanie miało charakter prospektywny, jednośrodkowy. **Materiał** kliniczny stanowiło 20 chorych z rozpoznaniem tętniaka aorty piersiowo-brzuszej leczonych w okresie od kwietnia do sierpnia 2021 w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Wskazaniem do wszczęcia stentgraftu była maksymalna średnica aorty ≥ 55 mm lub szybki wzrost średnicy tętniaka (≥ 10 mm w ciągu 12 miesięcy).

W **metodzie** doktorantka opisała kryteria włączenia i wykluczenia z badania, operację wewnątrznaczyniową polegającą na wszczęciu stentu typu t-Branch z poczwórnym szkieletem naczyniowym oraz leczenie farmakologiczne w okresie okołozabiegowym.

Kolejno doktorantka przedstawiła szczegółowo przeprowadzone u chorych badania. Materiał do badań laboratoryjnych, mających na celu analizę parametrów NETozy, układu białokrwinkowego, stanu zapalnego i układu krzepnięcia pobierała w okresie przedoperacyjnym (w ciągu 24 godzin przed operacją) oraz pooperacyjnym (w 3. i 5. dobie pooperacyjnej). Wolno krążące DNA (cfDNA) izolowała z próbek pobranej krwi przy użyciu zestawu do izolacji DNA MagMAXTM Cell-Free, a dwuniciowy DNA (dsDNA) i jednoliciowy DNA (ssDNA) izolowała przy użyciu zestawów Qubit dsDNA HS i ssDNA Assay Kit. Stężenie Cit-H3 oznaczła doktorantka za pomocą enzymatycznego testu immunologicznego metodą ELISA. W zautomatyzowanych analizatorach hematologicznych zbadała parametry układu białokrwinkowego (w tym neutrofile, limfocyty, monocyty, bazofile i eozynofile), stanu zapalnego (CRP i prokalcytonina), układu krzepnięcia (w tym liczbę płytek i parametry płytkowe, czas protrombinowy, międzynarodowy współczynnik znormalizowany, fibrynogen, czas częściowej tromboplastyny po aktywacji).

W końcowej części opisu metody doktorantka opisała kryteria rozpoznania zespołu poimplantacyjnego.

Rok po wykonanym zabiegu doktorantka przeprowadziła kontrolę celem oceny stanu zdrowia badanych chorych, definiując jednocześnie punkty końcowe: zgon lub hospitalizację chorego. Opis metody kończy krótki zarys zastosowanych metod statystycznych.

W kolejnym rozdziale doktorantka przedstawiła szczegółowe informacje dotyczące badanych chorych. Rozdział ten zatytułowała „**materiał**”, chociaż przedstawione dane stanowią również wyniki przeprowadzonej analizy. Doktorantka opisała szczegółowo parametry kliniczne badanych chorych, w tym informacje dotyczące samych tętniaków aorty, choroby współistniejące, przyjmowane leki i przebieg pooperacyjny.

W kolejnej części pracy doktorantka przedstawiła **wyniki** badań laboratoryjnych.

Jako najważniejsze z nich można uznać obserwowany przez doktorantkę znamieny wzrost parametrów NETs po operacji wewnątrznaczyniowej tętniaka aorty piersiowo-brzuszej. Wykazała ona wzrost wszystkich trzech markerów NETs w 3. dobie pooperacyjnej w porównaniu z okresem sprzed operacji: dwuniciowego DNA (dsDNA), jednoniciowego DNA (ssDNA) oraz cytrulinowanych histonów H3 (Cit-H3).

W jej obserwacji poziom histonów przed operacją i w 5. dobie pooperacyjnej nie różnił się. Natomiast stężenia dsDNA i ssDNA w 5. dobie pooperacyjnej były wyższe niż przed implantacją stentgraftu. Na podstawie wyników korelacji rang Spearmana doktorantka wykazała silną korelację pomiędzy ssDNA i dsDNA, ale nie stwierdziła korelacji między parametrami NETozy a parametrami stanu zapalnego, układu krzepnięcia i układu białokrwinkowego.

W okresie okołoperacyjnym doktorantka stwierdziła znaczące zmiany we frakcji układu białokrwinkowego, stanu zapalnego i układu krzepnięcia. Natomiast u żadnego z badanych nie zdiagnozowała zespołu poimplantacyjnego, przy czym szereg z chorych prezentowało odchylenia w zakresie poszczególnych jego parametrów.

W obserwacji odległej doktorantka obserwowała 2 zgony i 5 hospitalizacji. Po przeprowadzeniu analizy metodą Coxa udowodniła, że czynnikami ryzyka wystąpienia punktu końcowego (hospitalizacji lub zgonu) są: wzrost stężenia dsDNA i ssDNA w 2. dobie; wzrost liczby neutrofili w 3. i 5. dobie pooperacyjnej oraz wzrost stosunku neutrofili do limfocytów w 3. i 5. dobie pooperacyjnej.

Wyniki pracy zostały przedstawione w sposób bardzo szczegółowy w postaci opisowej, rycin i tabel, co budzi zaufanie wobec wniosków doktorantki. Autorka niezwykle dokładnie omówiła zebrane dane i przeprowadziła ich analizę, co pozwala czytelnikowi na pełne zrozumienie prezentowanych wyników. W przygotowaniu manuskryptu do publikacji niezbędne będzie znaczne skrócenie tej części pracy z pozostawieniem informacji dotyczących elementów stanowiących jej kwintesencję.

Dyskusja, w której doktorantka odniosła wyniki swojej analizy do prac innych autorów przeprowadzona jest w sposób nie budzący zastrzeżeń.

Z przeprowadzonego badania, po analizie wyników doktorantka wyciągnęła 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 neutrofilów co świadczy o aktywacji neutrofilów.
2. Stężenie jednoniciowego DNA (ssDNA) koreluje ze stężeniem dwuniciowego DNA (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 2. pobraniu), ssDNA (w 2. pobraniu), neutrofile (w 2. i 3. pobraniu), stosunek neutrofilów do limfocytów (w 2. i 3. pobraniu). Ocena tych parametrów pomaga określić ryzyko wystąpienia powikłań pooperacyjnych.

Przedstawione wnioski budzą ze strony recenzenta pewne zastrzeżenia.

W przeprowadzonym badaniu nie jesteśmy w stanie ocenić, czy obserwowany wzrost wybranych parametrów laboratoryjnych po umieszczeniu w aorcie stentgraftu jest konsekwencją procesów zachodzących ścianie tętniaka lub jego świetle, czy też jest on związany z urazem chirurgicznym, jakim jest wykonanie dostępu do tętnic udowej i pachowej. Rozwiązaniem tego problemu byłoby utworzenie grupy kontrolnej złożonej z chorych poddanych niewielkiej operacji chirurgicznej, takiej jak np. safenektomia. Dodatkowo odpowiedź ustroju w zakresie badanych parametrów na zastosowanie materiału sztucznego można by zbadać pobierając krew od chorych poddanych profundoplastyce (lub plastyce przepukliny pachwinowej) z zastosowaniem materiału sztucznego. Stworzenie grupy lub grup kontrolnych zwiększyłoby koszty, ale analiza porównawcza w istotny sposób podniosłaby wartość przeprowadzonego badania, a w szczególności pierwszego wniosku.

Drugi wniosek sugerujący możliwość wykorzystania jednoniciowego DNA jako markera NETozy wydaje się być zbyt ogólny biorąc pod uwagę niewielką grupę badaną.

Natomiast wniosek 3., szczególnie w zakresie dotyczącym liczby neutrofilów oraz stosunku neutrofilów do limfocytów, jest bardzo istotny z punktu widzenia klinicznego i stanowi może podstawę do zwrócenia dodatkowej uwagi na chorych po implantacji stentgraftu, u których są one obserwowane.

Piśmiennictwo rozprawy doktorskiej stanowi 110 aktualnych pozycji literaturowych, z których 95 zostały opublikowane w XXI wieku, a 62 w ciągu ostatnich 10 lat. Na uwagę zasługuje fakt prawie całkowitego pominięcia prac autorów polskich, co jedynie częściowo można tłumaczyć brakiem prowadzenia badań w omawianym zakresie przez polskich badaczy.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska lekarki Mileny Michalskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)".

Dowodzi ona dużej wiedzy doktorantki na temat omawianych zagadnień opartej na wnikliwym przeanalizowaniu dostępnego piśmiennictwa. Lekarka Milena Michalska wykazała się umiejętnością zaplanowania i realizacji pracy badawczej oraz analizy uzyskanych wyników, zaś oceniana rozprawa stanowi samodzielny, oryginalny i wartościowy dorobek naukowy.

Nowatorstwo pracy lekarki Mileny Michalskiej polega na ocenie czynności neutrofilów i sieci neutrofilowych w okresie pooperacyjnym po wszczepieniu stentgraftu do aorty piersiowo-brzuszej.

Chciałbym podkreślić, że uwagi recenzenta nie podważają merytorycznych podstaw pracy, a jedynie stanowią propozycję doprecyzowania wybranych zagadnień w przygotowaniu manuskryptu do publikacji w indeksowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Wobec powyższego mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarki Mileny Michalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej,
Naczyniowej i Transplantacyjnej
40-027 Katowice, ul. Francuska 20-24
tel. 32 255 50 52

DR HEB. MED. JACEK ZIĄBA
SPECJALISTA CHIRURG