

Zabrze, 3.07.2023 r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpł. dnia	11-07-2023
L. dz. RN-BM/	1241

O C E N A

pracy doktorskiej **lek. Grzegorza Wysoczańskiego** pt. „Ekspresja wybranych cząstek mikro-RNA u pacjentów poddawanych chirurgicznej rewaskularyzacji naczyń wieńcowych z zastosowaniem różnych metod znieczulenia”.

Podczas chirurgicznej rewaskularyzacji naczyń wieńcowych z użyciem krążenia pozaustrojowego dochodzi do wystąpienia urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego operowanego serca, a nasilenie tego procesu ma istotny wpływ na prawidłowy przebieg okresu pooperacyjnego. Udowodniono, że różne środki farmakologiczne (w tym niektóre anestetyki) mogą inicjować aktywność szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za wytworzenie odporności mięśnia sercowego na uraz niedokrwienno-reperfuzyjny. Ten korzystny mechanizm określany jest jako farmakologiczne hartowanie lub kondycjonowanie serca.

Udowodniono, że farmakologiczne kondycjonowanie serca jest zjawiskiem którego obecność można obserwować za pomocą dynamiki zmian stężeń biomarkerów niedokrwienia mięśnia sercowego, jednak niestety pozostaje ono znacznie trudniejsze do wykrycia na poziomie klinicznym. Dysponujemy dziś coraz bardziej czułymi i swoistymi biomarkerami do diagnozowania niedokrwienia mięśnia sercowego, za pomocą których można obserwować nasilenie interesującego nas urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego. Ostatnio próbuje się wykorzystać do tego celu tzw. mikro-RNA (miRNA) – jednoniciowe, niekodujące RNA, rozsiane po całym genomie człowieka. Niektóre z nich (miRNA-499, miRNA-133, miRNA-1 oraz miRNA-21) budzą szczególne zainteresowanie jako wyjątkowo czułe wskaźniki nasilenia lub hamowania zjawiska remodelingu serca oraz powstawania urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego. Doktorant postanowił więc ocenić kinetykę i profil okołopooperacyjny wyżej wymienionych miRNA, a także ocenić ich przydatność jako biomarkerów urazu mięśnia sercowego w relacji do standardowo oznaczanych biomarkerów (CK-MB i troponiny I), we wczesnym okresie pooperacyjnym po rewaskularyzacji naczyń wieńcowych w krążeniu pozaustrojowym. Temat badawczy podjęty przez lek. Grzegorza Wysoczańskiego uważam więc za bardzo istotny klinicznie, interesujący i aktualny.

Oceniana praca została wydana w formie monografii i zawiera 137 stron tekstu wraz z dokumentacją, obejmującą 10 rycin i aż 34 tabele. Bibliografia obejmuje 208 pozycji. Prace zostały prawidłowo zacytowane w tekście, a piśmiennictwo obejmuje w zdecydowanej większości prace opublikowane w ostatnich latach w renomowanych czasopismach zagranicznych. Rozprawa doktorska posiada typowy układ redakcyjny. Elementy graficzne zostały umieszczone w tekście wyników, co sprawia, że analiza tekstu w oparciu o tabele i ryciny jest znacznie ułatwiona.

Pracę otwiera niezwykle obszerny wstęp, w którym Autor przedstawia istotę mechanizmu niedokrwienno-reperfuzyjnego uszkodzenia mięśnia sercowego, zjawisko hartowania (kondycjonowania) farmakologicznego, a także dokonuje przeglądu wszystkich znanych obecnie biomarkerów uszkodzenia mięśnia sercowego i urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego. Obszerny rozdział poświęca miRNA, analizując szczegółowo stan wiedzy na temat tych cząstek miRNA, których zastosowanie było istotą badania. Wstęp pracy jest niezwykle szczegółowy i zawiera bardzo wiele informacji, które okazują się później przydatne podczas analizy wyników. Dostrzega się bardzo dobrą znajomość zagadnienia przez Autora, a także znakomitą orientację w aktualnym piśmiennictwie, które zostało tu bogato wykorzystane.

Uwagę Recenzenta zwróciła też wyjątkowa staranność w przygotowaniu tekstu. Autor zadbał też o prostą formę przekazu, zdając sobie sprawę że omawiane zagadnienia będą trudne w odbiorze dla klinicystów, nie będących na ogół ekspertami w dziedzinie genetyki. Zdania są formułowane jasno i zrozumiale, w związku z czym lektura tego trudnego, fachowego tekstu nie powoduje zmęczenia u Czytelnika. Niektóre fragmenty tekstu dowodzą też imponującej wręcz wiedzy Doktoranta, czego przykładem może być wywód na 13 i 14 stronie monografii, w którym Autor przedstawia (wraz z odniesieniami do aktualnego piśmiennictwa!) aż 31 biomarkerów które próbowano dotąd wykorzystać w diagnostyce choroby niedokrwiennej serca i jej powikłań. Warto, aby tę część pracy udostępnić w przyszłości szerokiej rzeszy Czytelników np. w formie pracy pogładowej.

Jedyna drobna uwaga krytyczna dotyczy umiejscowienia wykazu skrótów użytych w tekście na końcu (a dokładnie na 118 stronie) monografii. Liczba skrótów używanych w tekście pracy jest wyjątkowo duża (łącznie jest ich 133). Wydaje się że lektura pracy byłaby znacznie łatwiejsza, gdyby nie trzeba było poszukiwać skrótów na końcu monografii.

Cele pracy są jasno sformułowane i precyzyjnie określone. Autor postanowił dokonać oceny kinetyki i profilu okołoperacyjnego wybranych cząstek miRNA monitorowanych we

krwi obwodowej oraz profilu okołoperacyjnego wybranych cząstek miRNA w śródoperacyjnie pobieranych bioptatach mięśnia prawego przedsionka serca. Oceniał również przydatność wybranych cząstek miRNA jako biomarkerów urazu mięśnia sercowego w relacji do standardowo oznaczanych markerów (CK-MB oraz troponiny I) we wczesnym okresie po wykonanej operacji.

Metodyka pracy została opracowana poprawnie. Badanie miało charakter prospektywny i wiązało się z przeprowadzeniem dodatkowych interwencji, w związku z czym na ich wykonanie uzyskano najpierw zgodę Komisji Bioetycznej, a następnie wszyscy pacjenci wyrazili świadomą zgodę na przeprowadzenie u nich badań. Prawidłowo przedstawiono definicje i bardzo rozsądnie zaplanowano wykluczenia z grupy badanej. Dokładnie omówiono technikę znieczulenia i przeprowadzenia zabiegu operacyjnego w krążeniu pozaustrojowym, która nie odbiegała zasadniczo od aktualnie obowiązujących, nowoczesnych standardów w tej dziedzinie. W jednej z grup stosowano podtrzymanie znieczulenia za pomocą anestetyku wziewnego (sewofluran), zaś w drugiej grupie stosowano w tym celu środek dożylny (propofol).

Wątpliwości Recenzenta budzą jednak w tym miejscu dwa zagadnienia. Pierwszym z nich jest domięśniowe zastosowanie morfiny w premedykacji. Ważniejsze jest jednak to, że nie została wykorzystana istniejąca (przynajmniej teoretycznie) możliwość uzyskania znacznie większej „czystości” grup badanych, poprzez zastosowanie w grupie I indukcji całkowicie wziewnej sewofluranem, a następnie zastosowania sewofluranu również w sedacji pooperacyjnej (np. za pomocą systemu Mirus lub AnaConDa), co umożliwiłoby zupełną rezygnację ze stosowania środków dożylnych i znaczne wydłużenie czasu ekspozycji na anestetyki wziewne w tej grupie badanej.

Grupy badane były stosunkowo nieliczne – w każdej z nich znalazło się zaledwie 20 pacjentów. W tej sytuacji, przy prawidłowo zastosowanej randomizacji prawie niemożliwe powinno być pojawienie się istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie podstawowych parametrów demograficznych czy też wyjściowych obciążeń zdrowotnych, tak więc z metodologicznego punktu widzenia niewiele sensu ma późniejsze określanie poziomu istotności statystycznej dla każdego z przeprowadzonych porównań.

Bardzo starannie zaplanowano wykluczenia chorych z badania. Tak restrykcyjne założenia zapewniły pełną porównywalność grup badanych, jednak wykluczenia obejmowały jedynie przedoperacyjne obciążenia zdrowotne. Uwagę Recenzenta zwraca fakt, iż Autor nie przewidział w ogóle żadnych wykluczeń pacjentów już podczas trwania badania, a – logicznie

rzecz ujmując – wykluczenia takie powinny zostać zaplanowane (i tym samym opisane w metodyce pracy). Warto byłoby bowiem zdefiniować *a priori*, czy do grupy badanej zostaliby włączeni chorzy u których zabieg operacyjny powikłałby się w sposób mniej lub bardziej istotny (od „banalnej” konieczności wykonania resternotomii z powodu pooperacyjnego krwawienia lub tamponady, do wystąpienia rozległego zawału pooperacyjnego z koniecznością zastosowania wysokich dawek amin katecholowych, interwencji w pracownik diagnostyki inwazyjnej, czy też mechanicznego wspomagania krążenia, nie mówiąc już o sytuacji, w której nastąpiłby zgon pacjenta na bloku operacyjnym lub w okresie pooperacyjnym). Szczęśliwie nie doszło tu do ani jednego takiego zdarzenia, ale nie można przecież nigdy zakładać, że taka sytuacja nie może się wydarzyć.

W metodyce pracy zaplanowano użycie bogatego monitorowania hemodynamicznego za pomocą cewnika wprowadzonego do tętnicy płucnej. Pomiarów hemodynamicznych wykonywano w ściśle zaplanowanych odstępach czasowych. Bardzo trudną do interpretacji dla klinicysty metodologię badania ekspresji miRNA przedstawiono bardzo zwięźle (ale przy użyciu bardzo specjalistycznej terminologii) w rozdziale 3.2.3. Wydaje się że warto byłoby (ewentualnie) ten rozdział uzupełnić o jedno lub dwa cytowania pozycji piśmiennictwa, z których zainteresowany Czytelnik mógłby uzyskać pełną wiedzę co do metodologii tego rodzaju badań.

Wyniki pracy rozpoczynają się od przedstawienia i porównania charakterystyki grup badanych, zarówno w odniesieniu do danych demograficznych i parametrów przedoperacyjnych, jak i danych dotyczących okresu pooperacyjnego (tabele 1-4). Tak jak można było oczekiwać, pomiędzy badanymi grupami nie stwierdzono żadnych istotnych różnic. W tabeli 5 przedstawiono szczegółowo wyniki pomiarów hemodynamicznych, nie stwierdzając znaczących odchyłeń i w dalszym ciągu nie stwierdzając istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami. Oznacza to, że obie zastosowane metody znieczulenia zapewniły porównywalną stabilność układu krążenia, co stanowiło bardzo dobry punkt wyjścia do dalszych analiz. Analiza tabeli 6 wskazuje natomiast, że w badanej populacji nie wystąpiły też znaczące powikłania pooperacyjne.

Zasadnicza część wyników pracy rozpoczyna się na stronie 45. Autor dokonuje tam najpierw porównania dynamiki zmian stężeń CK-MB oraz troponiny I. Uzyskane wyniki nie były specjalnym zaskoczeniem – w obu grupach nastąpił bowiem istotny wzrost stężeń obu biomarkerów w porównaniu do ich wartości wyjściowych, jednak – co należy szczególnie podkreślić – nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi

grupami w analogicznych punktach czasowych. W kolejnych tabelach przedstawiono dynamikę zmian ekspresji wszystkich czterech analizowanych cząstek miRNA – również nie stwierdzając istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami w analogicznych punktach czasowych, zaobserwowano jednak interesujące zależności dotyczące zmian ekspresji miRNA w porównaniu do ich wartości wyjściowych. Wyniki tych analiz bardzo trudno jest interpretować z pozycji klinicysty, jednak po ich opublikowaniu mogą one w przyszłości stać się cennym punktem odniesienia dla innych badaczy, zajmujących się użytecznością różnych cząstek miRNA jako biomarkerów urazu niedokrwiennoreperfuzyjnego.

W kolejnym rozdziale wyników (5.4), Doktorant zajął się oceną wzajemnych korelacji tradycyjnych biomarkerów uszkodzenia mięśnia sercowego (CK-MB i troponiny I), oraz ekspresji wybranych cząstek miRNA w poszczególnych punktach czasowych. Okazało się, że tylko w dwóch przypadkach stężenia tradycyjnych biomarkerów korelowały istotnie z ekspresją badanych cząstek miRNA. To bardzo niewiele, biorąc pod uwagę, iż analizowano tu dwie różne metody znieczulenia, pięć różnych punktów czasowych, dwa tradycyjne biomarkery, oraz cztery podtypy miRNA, tak więc należy zakładać że przeprowadzonych równań korelacji musiało być kilkadziesiąt (dokładnie: $2 \times 5 \times 2 \times 4 = 80$). W opinii Recenzenta, uzyskana zaledwie w dwóch przypadkach korelacja może być więc znaleziskiem przypadkowym, którego interpretacja jest niezwykle ryzykowna. W tej sytuacji wniosek nr 7 recenzowanej pracy wydaje się niezbyt uprawniony, tym bardziej że w tekście pracy w ogóle nie znalazły się wyniki pozostałych przeprowadzonych równań korelacji. Różnic pomiędzy badanymi grupami nie stwierdzono również w zakresie ekspresji miRNA w bioptatach prawego przedsionka serca – zarówno przed rozpoczęciem krążenia pozaustrojowego, jak i w okresie reperfuzji (tabela 14-17).

Na kolejnych stronach monografii analizowano wpływ stopnia ekspresji miRNA na ryzyko wystąpienia pooperacyjnego migotania przedsionków, oraz profil kinetyki miRNA w zawale okołoperacyjnym. Okazało się, że żadna z badanych cząstek miRNA nie okazała się istotnym predyktorem wystąpienia migotania przedsionków. Profil kinetyki miRNA w zawale okołoperacyjnym można było jednak przeanalizować wyłącznie u dwóch pacjentów grupy I, którzy w okresie pooperacyjnym spełnili kryteria definicji zawału typu 5, co zdaniem Recenzenta również nie pozwala na wyciąganie daleko idących wniosków.

Rozdział 5.8 pracy poświęcono analizie wzajemnych korelacji ekspresji badanych cząstek miRNA we krwi pełnej w poszczególnych punktach czasowych. W tabelach 18-25

przedstawiono wyniki łącznie 180 równań korelacji (w rozbiściu na dwie metody znieczulenia oraz łącznie dla obu grup). Ten fragment testu jest tak trudny, że przeciętnemu Czytelnikowi niełatwo jest zorientować się jakie zależności są tu analizowane, nie mówiąc już o dokonaniu jakiegokolwiek próby interpretacji uzyskanych wyników.

Kolejny rozdział wyników (5.9) poświęcono analizie wzajemnych korelacji badanych podtypów miRNA w bioptatach mięśnia prawego przedsionka przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego. Z uwagi na obecność tylko dwóch punktów czasowych, ilość przedstawionych równań korelacji jest tu znacznie mniejsza (ale i tak osiąga liczbę 48). W kolejnych rozdziałach (5.10 i 5.11) analizowano związek odpowiednio: czasu krążenia pozustrojowego, czasu zaklemowania aorty, oraz czasu reperfuzji na poziom ekspresji badanych podtypów miRNA we krwi obwodowej i w bioptatach mięśnia prawego przedsionka (pobranych po zakończeniu krążenia pozaustrojowego). W kolejnych tabelach pojawia się tu więc wiele kolejnych, bardzo trudnych do interpretacji równań korelacji.

Po przebrnięciu przez niezwykle skomplikowany i obszerny rozdział poświęcony wynikom pracy, w kolejnej części dysertacji (tj. dyskusji pracy) można było oczekiwać równie skomplikowanych odniesień do dostępnego piśmiennictwa, z próbą interpretacji uzyskanych przez Autora wyników. Czytelnik przystępujący do lektury dyskusji pracy z takimi oczekiwaniami może jednak poczuć się nieco zaskoczony. Dyskusja ma zaledwie 13 stron, co stoi w pewnej sprzeczności z poprzedzającymi ją 35 stronami wyników. Okazuje się, że badania przeprowadzone przez Autora są w większości nowatorskie, stąd bezpośrednie porównanie uzyskanych wyników do wyników uzyskanych przez innych badaczy nie było możliwe w odniesieniu do większości przeprowadzonych analiz. Nie zmienia to faktu, iż – jak już zauważono poprzednio - wyniki przeprowadzonych analiz (po ich opublikowaniu) mogą w przyszłości stać się punktem odniesienia dla wielu innych badaczy, zajmujących się użytecznością różnych cząstek miRNA jako biomarkerów urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego.

Niezwykle interesującą i cenną częścią dyskusji pracy są ograniczenia pracy, które zostały wyodrębnione w postaci podrozdziału 6.7 dyskusji. Niezwykle rzadko zdarza się, aby zagadnieniu ograniczeń pracy poświęcono ponad dwie pełne strony tekstu. Świadczy to bardzo dobrze o krytycyzmie Doktoranta, który – jak widać – doskonale zdaje sobie sprawę, jak daleka jest droga od przełożenia bardzo skomplikowanych, trudnych do interpretacji wyników (w tym licznych równań korelacji) na wykorzystanie praktyczne uzyskanych informacji bezpośrednio przy łóżku chorego.

Pracę kończy aż 8 wniosków, z których część wymaga istotnego przeredagowania, tak aby nie przypominały one podsumowania wyników. Najistotniejszym pojedynczym wnioskiem płynącym z przeprowadzonych badań jest wniosek 8, jednak w opinii Recenzenta wymaga on również przeredagowania na następujący: „U chorych niskiego ryzyka poddanych chirurgicznej rewaskularyzacji naczyń wieńcowych monitorowanie uszkodzenia mięśnia sercowego za pomocą ekspresji wybranych miRNA nie wykazuje przewagi nad standardowo oznaczanymi stężeniami Tnl i CK-MB w surowicy”.

Całość pracy – pomimo uwag krytycznych, które powinny być niezbyt trudne do skorygowania przed wysłaniem pracy do publikacji - oceniam bardzo pozytywnie. Na szczególne podkreślenie zasługują w szczególności absolutne nowatorstwo, jak i aktualność pracy, a także znakomite przygotowanie merytoryczne i edytorskie. Uwzględniając fakt, iż temat jest ważny i aktualny, a konstrukcja pracy spełnia wszelkie obowiązujące standardy, należałoby bezwzględnie rozważyć publikację wyników tej pracy w czasopiśmie zagranicznym. Uwzględniając szerokie spektrum wyników oraz gotowy materiał na pracę pogładową we wstępie, oceniana dysertacja może być też opublikowana w postaci serii kilku artykułów o wysokim współczynniku oddziaływania.

W oparciu o powyższa opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Grzegorza Wysoczańskiego pt. „Ekspresja wybranych cząstek mikro-RNA u pacjentów poddawanych chirurgicznej rewaskularyzacji naczyń wieńcowych z zastosowaniem różnych metod znieczulenia” spełnia warunki określone w art. 13. Ust 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789).

Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Grzegorza Wysoczańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


KIEROWNIK
Klinika Kardiologii i Intensywnej Terapii
Katedry Anestezjologii i Intensywnej Terapii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Piotr Knapik