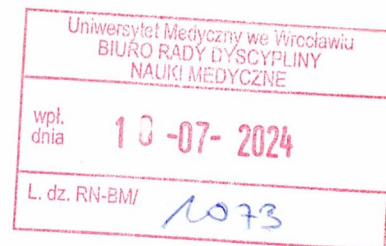


Prof. dr hab. dr h.c. Urszula Paślawska  
Katedra Diagnostyki i Nauk Klinicznych  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



**OCENA PRACY DOKTORSKIEJ**  
**Lek. med. Macieja Klepuszewskiego**

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE  
Przewodniczący  
prof. dr hab. Agnieszka Hałoń

**pt. „Humoralne mechanizmy w doświadczalnym modelu tachyarytmicznego wstrząsu kardiogenego”**

**wykonanej w pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Gajka**

Modele zwierzęce są powszechnie stosowane w badaniach nad układem krążenia, ponieważ żadne badania in vitro nie są w stanie oddać złożoności procesów przebiegających w żywym organizmie. Większość zwierzęcych modeli ostrej niewydolności serca (AHF) dotyczy zawału serca, natomiast opisywany model przewlekłej niewydolności serca (CHF) oparty o szybką, długoterminową (rzędu przynajmniej kilkunastu dni) stymulację komórek (RVP-CHF) wykorzystywany jest rzadko. Do jego najważniejszych atutów należy podobieństwo mechanizmów humoralnych zaangażowanych w rozwój CHF występującej u ludzi. Aktywacja tych mechanizmów jest tylko w przypadku AHF uznawana za pożądaną reakcję adaptacyjną, pozwalającą zachować minimalną perfuzję ważnych dla przeżycia narządów. Natomiast w przypadku CHF nie kontrolowana aktywacja mechanizmów humoralnych i neurohumoralnych, prowadzi do progresji choroby i jest związana z wyższą śmiertelnością. Ingerencja farmakologiczna w układy humoralne i neurohumoralne stanowi podstawę nowoczesnego leczenia CHF, a coraz częściej pojawiają się propozycje ingerencji w układy humoralne i neurohumoralne również w przypadku AHF. AHF była doświadczalnie wywoływana przy wykorzystaniu modelu zatrzymania krążenia w mechanizmie migotania komór (VF). VF charakteryzuje się największym nasileniem wywoływanych zaburzeń w obrębie układu krążenia, ale towarzyszy jej wysoka śmiertelność zwierząt doświadczalnych. Z tych powodów autor pracy przedstawionej do oceny uznał, że istnieje potrzeba wytworzenia doświadczalnego modelu AHF prowadzącego do wstrząsu kardiogenego, ale nie opartego

całkowite o zatrzymanie akcji serca, którego kontrola byłaby łatwiejsza niż w przypadku VF i który spowoduje dostatecznie silną odpowiedź humoralną.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska liczy 120 stron wydruku komputerowego, w tym 8 stron piśmiennictwa (245 pozycji). Ponadto praca zawiera 41 rycin oraz 15 tabel dokumentujących wyniki przeprowadzonych badań.

Wstęp jest wyczerpujący i obszerny - liczy 25 stron. Przedstawia on obecny stan wiedzy na temat zwierzęcych modeli niewydolności serca. Autor, co zrozumiałe, najwięcej uwagi poświęcił modelom zwierzęcym opartym o szybką stymulację komórek (RVP-AHF). Wstęp został podzielony na kilka części. Zazwyczaj nadaje się im kolejne numery, ułatwiające orientację czytelnikowi. Autor takiej metody porządkowania nie zastosował, ale pomimo to orientacja w treść wstępu nie nastęrcza trudności. Wydaje się że logiczne byłoby podzielenie podpunktów porządkujących wstęp na dwie grupy, ze względu na omawianą treść. Pierwszą grupę tworzą początkowe trzy podpunkty, w których autor omawia trzy modele niewydolności serca: niedokrwienny, toksyczny i model tachyarytmii stymulowanej. Drugą grupę tworzą podpunkty omawiające mechanizmy humoralne takie jak: aktywacja neurohumoralna i obwodowa w trakcie RVP, układ endotelin i grupa czynników martwicy nowotworu. Wstęp zakończony jest podsumowaniem, w którym autor stwierdza, że zwierzęcy model oparty o RVP pomimo szeregu zalet i ugruntowanej pozycji w badaniach eksperymentalnych układu krążenia stał się w ostatnich latach trudny do zastosowania, ponieważ brak jest urządzeń zdolnych do RVP bez konieczności ich modyfikacji. Stosowanie układów zmodyfikowanych może wpływać na charakterystykę wywoływanych zmian w zależności od zastosowanego wzorca stymulowania. Autor zwraca uwagę, że w poprzednich badaniach ustalano dowolnie granice pomiędzy stymulacją ostrą i przewlekłą, gdyż zakładano, że RVP doprowadza do wstrząsu kardiogenego lub też tylko do CHF w zależności od częstości stymulacji (PR). W rzeczywistości zauważono ogromną zmienność podatności zwierząt na RVP. Autor słusznie zauważa, że wciąż niewiele wiadomo na temat mechanizmów humoralnych i tolerancji częstoskurczów w sercach przewlekle niewydolnych, pomimo zwiększonej częstości występowania groźnych arytmii komorowych u osób z CHF. Poznanie mechanizmów humoralnych zachodzących w trakcie różnych faz rozwoju niewydolności serca nie tylko dopełnia w sposób komplementarny dane hemodynamiczne i echokardiograficzne, ale może stać się celem strategii terapeutycznych.

Autor wyznaczył sobie trzy poprawnie sformułowane cele pracy: 1) Utworzenie modelu ostrej niewydolności serca/wstrząsu kardiogenego opartego o szybką stymulację komórek serca (RVP), imitującą utrwalony częstoskurcz komorowy (sVT) 2) Zastosowanie utworzonego

modelu do symulacji częstoskurczu komorowego przebiegającego ze wstrząsem kardiogenym w sercu uprzednio zdrowym i niewydolnym oraz 3) identyfikacja zachodzących reakcji humoralnych na przykładzie endoteliny-1 (ET-1) i czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ ).

Praca wyróżnia się tym, że badanie zostało przeprowadzone na jednym zwierzęciu doświadczalnym, co jest jej słabą stroną, ale z drugiej strony taki model umożliwiał zniwelowanie różnic międzyosobniczych. Jediną zmienną był czas trwania i szybkość stymulacji, co z kolei jest mocną stroną doświadczenia. Metodyka badania została właściwie wybrana i została opisana w sposób klarowny w podpunktach: procedura znieczulania celem wszczepienia rozrusznika, procedura implantacji układu stymulującego, procedura sesji doświadczalnych, procedura programowania stymulatora, sposób monitorowania zwierzęcia i sposób rejestracji danych. Zwierzę było znieczulane standardowo, natomiast układ stymulujący wszczepiono niestandardowo, ponieważ użyto dwóch dwubiegunowych elektrod śrubowych, które zostały wprowadzone przez żyłę szyjną wewnętrzną do prawej komory serca i zakotwiczone w mięśniu sercowym blisko koniuszka i blisko siebie. Łącznie przeprowadzono 10 sesji doświadczalnych, w odstępie co 2 tygodnie. Stosowano RVP ze wzrastającymi częstotliwościami, każda częstotliwość była aplikowana przez 10 min, po czym następowało jej zwiększenie do następnej wartości lub wyłączenie stymulatora, jeśli uprzednio osiągnięto już maksymalną zaplanowaną PR. Sesje podzielono na dwie grupy. Sześć pierwszych sesji stymulacji dotyczyły serca nieuszkodzonego tj. dotyczyło zwierzęcia ze spontaniczną akcją serca. Grupa druga, to cztery sesje przeprowadzone u zwierzęcia, u którego narzucenie szybkiego rytmu 160/min. doprowadziło do CHF. Autor opisał zarejestrowane zjawiska tj. rozkojarzenie elektromechaniczne, symulowany częstoskurczu dwukierunkowego oraz alternans pulsu i EKG.

Autor zastosował ciekawy sposób dyskusowania wyników swojej pracy doktorskiej, a mianowicie stawiał sobie pytania, na które odpowiadał przy pomocy uzyskanych wyników i informacji pozyskanych z przeglądu literatury. W pierwszej części dyskusji stwierdza że stworzony model jest zdolny do indukcji wstrząsu kardiogenego zarówno u zwierzęcia z niewydolnym, jak i zdrowym sercem, jakkolwiek dopóki serce było zdrowe, to hemodynamiczne i echokardiograficzne cechy wstrząsu występowały dopiero przy najwyższych PR. W przypadku CHF tolerancja symulowanego częstoskurczu komorowego maleje. Najwięcej wątpliwości budzi ocena echokardiograficzna czynności serca, ze względu na zastosowanie metody Teicholza, ale autor słusznie zauważa, że oparcie się na zalecanych projekcjach koniuszkowych jest u dorosłych świń w badaniu przezklatkowym obarczone nie

mniejszym błędem. W literaturze można spotkać wyniki przezklatkowych badań echokardiograficznych z użyciem metody sumowania dysków Simpsona, ale dotyczą one zwierząt poniżej 100 kg. m.c. U zwierząt cięższych były uzyskiwane w inny sposób np. za pomocą głowicy przelykowej lub nasierdziowej. Autor uznał, że echokardiograficzny pomiar rzutu minutowego serca (CO) na podstawie formuły Teicholza należy traktować szacunkowo, co było istotne, ponieważ CO to jeden z kluczowych parametrów hemodynamicznych oceny wstrząsu kardiogenego, definiowanego jako niedostateczny CO w stosunku do indeksu serca. Niemniej okazuje się, że to właśnie ciśnienie tętnicze w trakcie utrwalonego częstoskurczu komorowego, a nie CO, przesądza o jego dobrej lub złej tolerancji klinicznej a pomiary ciśnienia tętniczego w prezentowanym badaniu były prowadzone według złotego standardu. Natomiast echokardiograficzny pomiar wymiarów ścian i jam komór serca pomiędzy i w trakcie trwania sesji doświadczalnych oraz frakcji skracania nie budzi żadnych zastrzeżeń.

Wiadomym jest, że stężenie ET-1 i TNF- $\alpha$  wzrasta wraz ze stopniem CHF, a ich stężenie koreluje z poziomem peptydów natriuretycznych. Najwyższe stężenia TNF- $\alpha$  obserwowano u pacjentów wyniszczonych CHF, dlatego cytokina ta początkowo nazywana była kacheksyną. RVP w sercu przewlekle niewydolnym powoduje wyższy wzrost ET-1 niż w sercu zdrowym. Stężenia ET-1 wykazywały dodatnią korelację z PR i były tym wyższe im była późniejsza sesja doświadczalna. Stężenie ET-1 korelowało ujemnie z ciśnieniem tętniczym. TNF- $\alpha$  był istotnie wyższy w sercu chorym w porównaniu do zdrowego, ale ta cytokina wykazywała zaskakujące wartości. Po pierwsze wykazywała znacznie większe różnicowanie wartości – większy rozrzut danych, a poza tym w sercu zdrowym wykazywała, względnie silną ujemną, korelację z numerem sesji. Autor nie przedstawił przekonującego wytłumaczenia obserwowanego fenomenu. Inną ciekawą obserwacją był wzrost parametrów czerwonych w czasie stymulacji serca niewydolnego. Zaobserwowane przyrosty znacząco przekraczają zdolności szpiku kostnego do erytropoezy i dlatego autor wysnuł hipotezę, że są one wyrazem przesunięcia składników osocza, a przede wszystkim wody, do przestrzeni pozanaczyniowej oraz wtórnego zagęszczenia elementów morfotycznych krwi w mechanizmie wstrząsu kardiogenego.

W opinii recenzentki wnioski są tak liczne i obszernie opisane, że bardziej pasuje do nich określenie podsumowanie. Warto by było przeanalizować je krytycznie raz jeszcze i wybrać te, które są najistotniejsze z punktu widzenia wkładu w postęp wiedzy.

Przedłożona praca została przygotowana bardzo starannie. Znaleziono nieliczne błędy stylistyczne i interpunkcyjne które powinny zostać poprawione, jeżeli autor zamierza opublikować pracę w języku polskim.

Warty podkreślenia jest szeroka znajomość piśmiennictwa dotyczącego tematu pracy i zdolność krytycznej analizy otrzymanych wyników. O tej ostatniej umiejętności przekonuje czytelnika nie tylko dyskusja, ale i poprawnie sformułowany podrozdział ograniczenia badania.

Uwagi przedstawiane w niniejszej recenzji w najmniejszym stopniu nie obniżają wartości merytorycznej pracy i mogą być uwzględnione przy ostatecznym redagowaniu pracy do publikacji.

Podsumowując, pragnę jeszcze raz podkreślić trafność i przydatność tematu. Przeprowadzone badania należy traktować jako wstępne, ponieważ zostały przeprowadzone tylko na jednym zwierzęciu, ale uzyskane wyniki są wartościowe z naukowego punktu widzenia, ponieważ dokumentują, że stworzony został nowy model RVP-AHF dobrze odwzorowujący AHF u ludzi w przebiegu częstoskurczu. Model ten może być wykorzystany do dalszych badań nad tym groźnym stanem chorobowym.

Rozprawa doktorska lek. med. Macieja Klepuszewskiego spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniu i tytule w zakresie sztuki\*(Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.) stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. Przedkładam, więc Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. med. Macieja Klepuszewskiego do dalszego etapu przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. dr h.c. Urszula Paślawska

Toruń, 12.07.2024