

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Katedra Kosmetologii i Dermatologii Estetycznej

85-067 Bydgoszcz, ul. Jagiellońska 13-15

e-mail: kkosmet@cm.umk.pl

tel. (52) 585-3424

prof.dr hab.n.med. Barbara Zegarska

Bydgoszcz 13.06.2019

Katedra Kosmetologii

i Dermatologii Estetycznej

Collegium Medicum w Bydgoszczy,

UMK w Toruniu

Ocena rozprawy doktorskiej lekarza medycyny Wiktora Paskala pt.

„Wpływ N-acetylocysteiny na gojenie ran chirurgicznych na modelu szczurzym”.

Promotor: prof. dr hab. n. med. Paweł Włodarski

1. **Wartość naukowa rozprawy**

a. Oryginalność badań:

Problematyka przedstawionej mi do recenzji pracy dotyczy próby zastosowania znanego leku – N-acetylocysteiny w promocji gojenia ran chirurgicznych na modelu zwierzęcym. Badanie wpływu znanych i nowych substancji na proces gojenia stanowi przedmiot wielu opublikowanych i prowadzonych aktualnie badań (w momencie przygotowania recenzji w bazie Pubmed dostępnych jest 35766 artykułów poruszających problem gojenia ran). Stanowi to odzwierciedlenie istotności klinicznej problemu. Szczególnie poszukuje się nowych, skutecznych rozwiązań, w gojeniu ran przewlekłych. Proponowana praca doktorska zawęza zastosowanie N-acetylocysteiny do weryfikacji jej

działania w przypadku wykonania prostego nacięcia skóry z zaopatrzeniem chirurgicznym. Dostępna literatura wskazuje, iż badano zastosowanie N-acetylocysteiny na modelu zwierzęcym. Wykazano jej skuteczność w różnych modelach uszkodzeń skóry, głównie w uszkodzeniach radiacyjnych. Dotąd nie przeprowadzono badania skuteczności tej substancji w gojeniu ran zaopatrzonych chirurgicznie z uwzględnieniem podania N-acetylocysteiny przed dokonaniem nacięcia. Stanowi to o oryginalności przedstawianej rozprawy i precyzyjnie lokuje jej potencjalne zastosowanie kliniczne jako dodatku do powszechnie stosowanego znieczulenia nasiękowego.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów:

Praca została podzielona na 13 rozdziałów. Wstęp zawiera zwięzły rys historyczny problematyki gojenia ran uzupełniony rozważaniami nad wybranymi aspektami klinicznymi gojenia ran. W kolejnych częściach Autor opisuje fazy przebiegu gojenia wzbogacając opis autorską ryciną. Wartościowym i szczegółowo omówionym elementem wstępu jest opis „aspektów zapalnych procesów gojenia”, który stanowi podsumowanie aktualnej wiedzy nt. roli poszczególnych elementów układu immunologicznego, cytokin i szlaków komórkowych na fazy procesu gojenia. Autor rozprawy odniósł się do problematyki zwierzęcych modeli ran pokazując ich różnorodność na wybranych przykładach. Wstęp wieńczy rozdział omawiający metody wykorzystywane do oceny zaawansowania procesu gojenia, autor opisuje zarówno metody makroskopowej, mikroskopowej oraz funkcjonalnej oceny gojenia. Na szczególną uwagę zasługują załączone tabele, które przedstawiają możliwości i metody oceny parametrów gojenia z podziałem na sposób pomiaru wartości wybranych elementów histologicznych. Wstęp z perspektywy naukowej jest wyczerpujący, podsumowuje najważniejsze prace obejmujące poruszaną przez autora tematykę i przy odpowiednim rozwinięciu może stanowić osobne krótkie doniesienia. Przedstawiony opis zastosowanych metod jest bardzo szczegółowy, umożliwia odtworzenie poszczególnych technik przez innych badaczy. Rozdział „Dyskusja” w przedstawianej pracy jest przydatnym omówieniem wyników molekularnych oraz znalezisk histologicznych, które miały miejsce w tym badaniu na tle dotychczasowych doniesień naukowych. Autor opatrzył komentarzem większość z nadeksprimowanych genów w grupie badanej, interpretacje były podparte cytowaniem licznych artykułów z ogólnodostępnej literatury fachowej. Wnioski wskazują, iż wyniki uzyskane w tym badaniu mogą mieć dalsze implikacje w zastosowaniu klinicznym, co przemawia za potencjałem translacyjnym opisanego badania.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Autor wykorzystał wstęp do przedstawienia ogólnych tematów związanych z gojeniem ran lub ich badaniem, aby wprowadzić czytelnika w poruszaną problematykę. Po lekturze samego wstępu można odnieść wrażenie, iż praca będzie koncentrowała się na aspektach zapalnych procesu gojenia, co jednak nie jest wiodącym tematem dalszych części manuskryptu. Wstęp pozwala na zapoznanie się z najważniejszymi problemami gojenia ran, działania i roli w tym procesie N-acetylocysteiny oraz sposobami oceniania przebiegu gojenia ran.

Cel badania i hipotezy przedstawiono w rozdziale „Założenia i cel pracy”, gdzie Autor uargumentował przyczynę podjęcia badania opierając się na translacji kontekstu klinicznego, doniesień z dostępnej literatury oraz brakiem tak przeprowadzonego badania w literaturze. Zasadnicza hipoteza badania dotyczyła weryfikacji czy N-acetylocysteina podana wraz ze znieczuleniem miejscowym przed wykonaniem nacięcia będzie miała korzystny wpływ na gojenie rany chirurgicznej. Wcześniej opisane w tym rozdziale założenia zawierały w sobie dodatkowe hipotezy, które dotyczyły mechanizmu w jakim cząsteczka miałyby zadziałać, co również Autor próbował zweryfikować w trakcie swoich badań. Dodatkowe cele badania są sformułowane w jednoznaczny sposób.

Aby odpowiedzieć na postawione pytania badawcze Autor posłużył się modelem zwierzęcym – samcami szczura szczepu SPRD/Mol/Lod. Warto odnotować, iż Autor załączył Uchwałę I Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie zezwalającą mu na podjęcie tego badania. Liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu jest o połowę mniejsza niż w uchwalonym dokumencie, co wymaga wyjaśnienia od Autora. Jednak ich liczba jest całkowicie wystarczająca (6 zwierząt na 1 punkt czasowy) ze względu na poparte literaturą wykonanie kilku cięć na grzbiecie każdego zwierzęcia zwiększające liczbę analizowanych ran. Technika wykonywanych nacięć i zaprezentowanego modelu jest powtarzalna i nie budzi żadnych zasadniczych wątpliwości. Warto docenić starania Autora o możliwie bezstronne przeprowadzenie badania – zadeklarowano zaślepienie operatora jak i osoby wykonującej iniekcje. Ustalono 4 punkty czasowe, w których uśmiercano kolejne zwierzęta. Autor mógłby wyjaśnić przyczynę wyboru takich punktów czasowych. Pobrane biopsje z ran poddano serii analiz, które obejmowały: standardowe barwienie histologiczne, barwienie

Trichromem Massona, barwienie immunohistochemiczne wobec 3 antygenów oraz badanie ekspresji genów metodą qPCR. Ponadto Autor wykonał dokumentację fotograficzną w 11 punktach czasowych, co przy zachowaniu szczegółowo opisanej standaryzacji fotografii, umożliwiło mu gradualną ocenę postępów gojenia.

O wiarygodności uzyskanych wyników decydują zobiektywizowane metody oceny poszczególnych parametrów histologicznych procesu gojenia ran (histomorfometria, skala Abramova, zautomatyzowana analiza ułożenia włókien kolagenowych). Ich zastosowanie wiąże się z uzyskaniem wysokiej jakości danych i większej odporności na błąd badacza. Przy stosowaniu subiektywnej skali Autor posiłkował się oceną 3 niezależnych badaczy. Badanie ekspresji genów metodą qPCR jest dobrym rozwiązaniem do poszukiwania mechanizmów molekularnych zaangażowanych w proces biologiczny. Warto docenić techniczne aspekty opisu i wykonania reakcji – w wielu punktach weryfikowano jakość produktów, reakcje wykonano w trzykrotnych powtórzeniach oraz zastosowano liczne kontrole wewnętrzne. Ma to odzwierciedlenie w wynikach, które wykazuje kompletny brak ekspresji tylko kilku genów, a wariacje ekspresji badanych genów z reguły mieszczą się w akceptowalnym zakresie. Podsumowując, zastosowane metody były zaplanowane proporcjonalnie do stawianych hipotez, choć do oceny szeroko opisywanych aspektów zapalnych posłużyły jedynie barwienia immunohistochemiczne i ekspresja wybranych genów w technice qPCR. Do pełnej oceny wpływu cząsteczki na funkcjonalny aspekt gojenia zabrakło wspomianej przez Autora oceny odporności na rozciąganie, ale to może być osobny aspekt dalszych badań. Do analizy danych wykorzystano popularne programy arkuszy kalkulacyjnych oraz pakietów statystycznych. Zastosowane testy pozwalały na dokładną analizę danych przedstawianych w wynikach. Bardzo cenną informacją jest deklaracja o zaślepieniu osoby dokonującej analizy statystycznej.

Wyniki zaprezentowano w postaci tabel, rycin z wykresami, rycin z fotografiami oraz rycin z mikrofotografiami, co znacznie podnosi wartość pracy, jak również ułatwia czytelnikowi analizę danych. Pierwsze dwie formy pozwalają na zaprezentowanie danych liczbowych. Zostały przygotowane w sposób przejrzysty i czytelny. Następnie poprawnie opisano wszystkie wyniki w tekście, dzieląc je na rozdziały według kolejnych metod analitycznych. Autor we właściwym momencie podał informacje na temat zastosowanej statystyki, które determinowały inną interpretację danych, co bez tego wyjaśnienia wprowadzałoby dużą niejasność interpretacyjną.

Dyskusję poświęcono interpretacji wyników i ich analizie. Autor odniósł się w licznych punktach do doniesień literaturowych, które opisywały istotność danej obserwacji

(histologicznej/molekularnej) dla procesu gojenia. Autor w swoich przemyśleniach odniósł się zarówno do aspektów hipotezy głównej jak i próby wyjaśnienia mechanizmu gojenia i wpływu cząsteczki na proces zapalny. Z odpowiednią dozą krytyki interpretował wyniki zarówno istotne jak i nieistotne statystycznie w celu uzyskania pewnych konkluzji. Autor mógł wyraźniej zaznaczyć ograniczoną wartość istotnych statystycznie wyników ekspresji genów w 60 dniu po nacięciu, które wykazywały mniej niż 2-krotną nadekspresję. Wartościowym elementem były liczne, relewantne odniesienia do literatury oraz poszukiwanie korelacji w obrębie własnych danych – zestawianie obserwacji histologicznych uzyskanych różnymi metodami, wyników ekspresji genów i wyników barwienia immunohistochemicznego.

Autor jasno zaprezentował najważniejsze obserwacje i wnioski płynące z tego badania w postaci osobnego rozdziału „Podsumowanie dyskusji i wnioski”. Autor nie obawiał się wspomnieć o wynikach negatywnych oraz wskazał dalsze kierunki badań. Wnioski są sformułowane ostrożnie, proporcjonalnie do mocy przedstawionych danych i są odpowiedzią na stawiane cele.

3. **Poprawność redakcyjna rozprawy**

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Rozprawa została przygotowana w formie jednolitego manuskryptu liczącego 94 strony maszynopisu. Pracę podzielono na 13 rozdziałów wliczając w to spis treści, spis rycin, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Następnie Autor przedstawiał w sposób typowy przebieg badania rozpoczynając od wstępu, z wyróżnieniem założenia i celów pracy, materiałów i metod, omówieniem wyników, dyskusją i osobnym jej podsumowaniem z przedstawieniem finalnego wniosku. W ostatnich rozdziałach Autor zamieścił listę piśmiennictwa w liczbie 157 pozycji w kolejności cytowania w tekście oraz kopię Uchwały I Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie. Układ pracy nie odbiega od typowego dla dysertacji. Autor podzielił większość rozdziałów na tematycznie odrębne podrozdziały co ułatwia zorientowanie się w opisie mnogich metod wykorzystanych w tym badaniu. Opis metod został wzbogacony licznymi tabelami oraz schematami, które ułatwiają zrozumienie idei prowadzonego badania czy pochodzenie danych przedstawionych w dalszej części manuskryptu. Wyniki zostały opisane w kolejności zgodnej z opisywanymi technikami badawczymi. Do ich przedstawienia Autor wykorzystał czytelne wykresy, tabele oraz zestawy fotografii lub mikrofotografii. Wykresy przygotowano w sposób typowy, z uwzględnieniem

średnich wyników dla danej grupy badanej lub kontrolnej, wraz z odchyleniem standardowym. Brakuje wizualnej prezentacji istotności statystycznej różnic w załączonych wykresach (Rycina 9, 10, 11, 17, 18). Interesująco przedstawiono wyniki badania ekspresji genów w postaci kolorowego schematu z podziałem genów według ich funkcji biologicznej. Pozostawienie tych wyników jedynie w formie tabeli byłoby mniej komfortowe do analizy. Styl przedstawionej pracy jest zgodny ze standardami raportowania wyników badań naukowych. Autor wykazuje tendencję do budowania długich i złożonych zdań, jednak można uznać, iż pracę przygotowano w sposób przejrzysty. Praca zawiera pewne błędy redakcyjno-edytorskie np. brak skrótu „DPA” w wykazie skrótów, obecność duplikatu Ryciny 5 (Strona 37) lub wstawienie podpisu Tabeli 2 w miejsce jej hiperłącza w tekście. Błędy te nie wpływają na merytoryczny aspekt tekstu.

4. Uwagi krytyczne

1. Z czego wynika rozbieżność w liczbie zwierząt w Materiałach i Metodach oraz w zgodzie z I Lokalnej Komisji Etycznej?
2. Zakres podawanych dawek jest względnie nieznaczny. Miało to swój wyraz w braku różnic między grupami eksperymentalnymi i kohortowanie we wspólną grupę w analizie statystycznej.

5. Ocena końcowa (uzasadnienie 25-200 słów):

Wspomniane powyżej drobne uwagi krytyczne absolutnie nie obniżają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej lek. med. Wiktora Paskala. Sposób przeprowadzenia zaplanowanych przez Doktoranta badań, rzeczowa dyskusja i przedstawione wnioski świadczą o dojrzałości naukowej i klinicznej Doktoranta oraz możliwości dalszego, samodzielnego już prowadzenia badań.

Ja, niżej podpisana/y stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska lek. Wiktora Paskala spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Wiktora Paskala do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK/NIE

Ja, niżej podpisana/y wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.
Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

TAK/NIE

Ze względu na szczególną wartość merytoryczną pod względem naukowo-poznawczym , a zwłaszcza klinicznym , zwracam się do Pana Dziekana oraz Wysokiej Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o jej wyróżnienie.

Za szczególne zalety ocenianej pracy doktorskiej uznaje :

1. Wybranie ciekawego i niezwykle istotnego tematu pracy doktorskiej mającego duże znaczenie zarówno naukowo-badawcze jak i praktyczne.
2. Autor wykazał się bardzo dużą rzetelnością i pracowitością już na etapie planowania badania.
3. Uzyskanie ciekawych i bardzo wartościowych wyników stanowiących uzupełnienie problematyki gojenia ran.
4. Mam nadzieję, że praca ta stanowi początek dalszych badań w tym niezwykle ciekawym temacie.

13.06.2019.
data sporządzenia recenzji

.....

.....
podpis recenzenta