



KATEDRA I ZAKŁAD PATOFIZJOLOGII
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
60-806 Poznań, ul. Rokietnicka 8
Tel. (48)(61)85476-24 (85476-20 - sekretariat)
Dr hab. n med. Katarzyna Korybalska, prof. UM
E-mail: koryb@ump.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Wiolety Kisiel pt. „Wpływ propofolu na wybrane parametry hemostazy i proces zakrzepowy u szczurów z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym”

Promotor: Prof. dr hab. Ewa Chabielska

Promotor pomocniczy: Dr hab. n. med. Marzena Wojewódzka-Żeleznikowicz

Przekazana recenzentowi w dniu 9.03.2018 r. przez dr hab. Wojciecha Miltę -

Dziekana Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Stosowanie leków znieczulających podczas zabiegów operacyjnych niesie ze sobą ingerencję w wiele procesów fizjologicznych. Jednym z takich procesów jest proces hemostazy, którego modyfikacja prowadzi do powikłań zatorowo-zakrzepowych bądź krwotocznych. W tym kontekście wybór tematu przez Doktorantkę uważam za bardzo trafny i ważny z klinicznego punktu widzenia.

Rozprawa doktorska mgr Wiolety Kisiel pt. „Wpływ propofolu na wybrane parametry hemostazy i proces zakrzepowy u szczurów z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym” liczy 115 stron i ma typowy układ treści podzielonej na: wstęp (34 strony), cel pracy (2 strony), materiał i metody (16 stron), wyniki (16 stron), dyskusję wraz z podsumowaniem (15 stron), wnioski (1 strony), streszczenie w języku polskim i angielskim (4 strony), oraz 230 pozycji piśmiennictwa wymienionego według kolejności cytowań w tekście. Dysertacja zawiera również wykaz stosowanych skrótów oraz rozdział poświęcony znaczeniu badań i ich przyszłej perspektywie. Do tak dobrze skomponowanej całości byłby również przydatny wykaz zamieszczonych w pracy rycin oraz tabel, co zwykle ułatwia analizowanie tekstu. Rozprawa została napisana w przejrzysty sposób, co ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z skomplikowanym procesem hemostazy. Autorka powinna jednak zredagować swoją rozprawę z większą starannością (błędy edytorskie, pewne niefortunne sformułowania).

Wstęp

Wstęp zawiera informacje o strukturze, mechanizmie działania, reakcjach niepożądanych propofolu oraz opisuje wiele skomplikowanych procedur, którym poddano lek, zanim zaczęto wykorzystywać go, jako bezpieczny i dobrze tolerowany lek anestetyczny. Opisuje również jego działanie plejotropowe, które koncentruje się m. in. na działaniu immunomodulującym, przeciwłękowym, neuroprotekcyjnym, regulującym ciśnienie i pracę serca oraz modulującym proces hemostazy. Działanie na proces hemostazy zostało obszernie udokumentowane w 5 tabelach z odpowiednimi odnośnikami literaturowymi.

Doktorantka trafnie zauważa, że wpływ leków anestetycznych na proces hemostazy w warunkach *in vivo* może być trudny do oceny ze względu na to, że sam zabieg operacyjny i stosowane w trakcie inne leki znacząco ingerują w proces krzepnięcia i fibrynolizy. Dlatego bardzo ważny jest dobór anestetyku nie tylko w odniesieniu do jego działania hemodynamicznego, lecz także wpływu na procesy zakrzepowo-zatorowe i krwawienia. Badania wpływu propofolu na proces hemostazy wydają się w tym kontekście uzasadnione zwłaszcza, że badania eksperymentalne i kliniczne pokazały wielotorowy, często przeciwny, wpływ propofolu na hemostazę, szczególnie na śródbłonek naczyniowy, płytki krwi, oraz układ krzepnięcia i fibrynolizy. Wobec powyższego bardzo istotnym jest badanie tego leku z wykorzystaniem standaryzowanych, izolowanych układów, którymi są modele zwierzęce oraz badania *in vitro*.

Ta część pracy jest wykonana bardzo rzetelnie wprowadzając czytelnika w skomplikowane badania procesu hemostazy, które są niezbędne do zrozumienia wykonywanych eksperymentów. Pewien niedosyt recenzenta budzi tylko część dotycząca interakcji farmakodynamicznych propofolu z wybranymi lekami i ich wpływu na hemostazę. W tej części doktorantka opisuje tylko wpływ leków, które potencjalnie mogą stosować pacjenci poddawani zabiegom operacyjnym z wykorzystaniem propofolu i opisuje ich wpływ na proces krzepnięcia i fibrynolizy. W większości przypadków, brak jest informacji o istniejących lub nieistniejących danych literaturowych, dokumentujących interakcje tych leków z badanym anestetykiem (NLPZ, leki przeciwplatekcyjne, statyny, leki hipoglikemiczne). Informacja taka pojawia się jedynie przy antykoagulantach, inhibitorach konwertazy angiotensyny oraz beta blokerach.

Cel pracy

Cel jest poprzedzony lapidarnym opisem działania propofolu, co z pewnością ułatwia zrozumienie pracy bez wcześniejszego zapoznania się ze wstępem. Jest jasno sprecyzowany z podziałem na cele *in vivo/ex vivo* oraz *in vitro*.

Materiał i Metody

Charakterystyka badań *in vivo* jest w większości precyzyjnie opisana i udokumentowana przejrzystymi schematami wykonywanych badań. Zamieszczenie jednego całościowego schematu, który pokazywałby kolejność wykonywanych badań, ułatwiłoby zrozumienie wielu procedur, którym zostały poddane zwierzęta laboratoryjne. W metodyce nie pojawiła się liczba zwierząt laboratoryjnych, którym wykonywano określone badania, nie wyszczególniono, jaki procent zwierząt z różnych przyczyn odpadł z eksperymentu (tzw. *dropout rate*). Nie sprecyzowano również stężenia VEH stosowanego w eksperymentach *in vivo*. Z zamieszczonych informacji o stosowanych odczynnikach (str. 40-42) wynika, że wyjściowe stężenie tej substancji to 10%. Nie ma informacji czy stężenie wyjściowe było przez badacza modyfikowane. Nie udokumentowano również, od kiedy zaczęto pomiar ciśnienia po podwiązaniu lewej tętnicy nerkowej. Wiadomo, że czas potrzebny do wyidukowania nadciśnienia trwał 6 tygodni, a pomiar ciśnienia był średnią z trzech pomiarów, ale nie wiadomo, w jakich odstępach czasu zostały one wykonane i czy był to jednorazowy pomiar, czy też był on oceniany w określonych przedziałach czasowych. Recenzent chętnie się dowie, czy 6 tygodni potrzebne do wyidukowania nadciśnienia to okres wyznaczony empirycznie przez doktorantkę, czy doktorantka oparła się na spójnych i niebudzących kontrowersji, doniesieniach literaturowych. Nie jest to jasno udokumentowane w metodyce. Te istotne informacje pojawiają się dopiero w dyskusji.

Idealnym modelem badawczym byłoby porównywanie wyników uzyskanych na szczurzych naczyniach krwionośnych w warunkach *in vivo* z badaniami *in vitro* analizującymi szczurze komórki śródbłónka. Nie jest to jednak zarzutem recenzenta. Użyte przez Doktorantkę komórki śródbłónka z żyły pępowinowej (HUVEC) są powszechnie stosowane w różnych modelach badawczych i wykazują wiele homologii do śródbłónka występującego w dużych naczyniach krwionośnych np. w aorcie. Metodyka badań *in vitro* nie informuje czytelnika precyzyjnie, jaki typ komórek śródbłónka z żyły pępowinowej został wykorzystany do badań. Czy były to komórki linii pierwotnej izolowane przez Doktorantkę z żyły pępowinowej, czy była to linia

komercyjna. Z fragmentu dyskusji dowiadujemy się, że: „Użyta w pracy hodowla komórek śródbłónka wywodziła się z linii komórek zdrowych”.

Pomimo tego, że doktorantka powołuje się na doniesienia literaturowe ciekawym byłoby wyjaśnienie, dlaczego czas inkubacji komórek śródbłónka z badanym lekiem wynosił tylko 30 min, a zwierzęta laboratoryjne otrzymywały wlew propofolu przez 100 min. Dodając do tego fazę szybkiej eliminacji leku (wstęp str. 6) trwającą 30-60 min, to okres ten jest prawie 5 krotnie dłuższy niż czas ekspozycji śródbłónka w warunkach *in vitro*.

Nie jest jasne czy parametry fibrynolizy były ocenione w medium hodowlanym czy w lizatach komórkowych. W części metodycznej pojawia się zdanie „Po okresie inkubacji komórki były poddane wirowaniu, a w uzyskanym supernatancie oznaczono immunoenzymatycznie stężenie t-PA, PAI-1 i TAFI” Może w tym zdaniu wkradł się błąd i zamiast komórek wirowano pobrane medium z hodowli komórkowej?

Wyniki

In vivo/ex vivo

Wyniki byłyby bardziej wiarygodne gdyby w tabeli podana była liczbowa wartość *p* dla grup PRO i VEH porównywana między sobą i dla odpowiednich punktów czasowych (Tab. 7, 8, 9, 10). Takie przedstawienie wyników pokazałoby, że dane były precyzyjnie analizowane statystycznie i u czytelnika nie pozostawia to wątpliwości. Żeby stwierdzić, że przepływ krwi zmniejszył się w PRO i VEH po 105 min vs. 0 min. dane muszą być potwierdzone statystycznie (Tab. 8). Nie ma tych informacji ani w tabeli, ani przy opisie wyników. Różnica jest na tyle duża, że z pewnością testy statystyczne to potwierdzą. W przypadku analizowania czasu krwawienia po PRO i VEH, opisując wyniki uzyskanych badań i pisząc o tendencji do skrócenia czasu krwawienia, warto by było w nawiasie podać wartość *p*, która jak sądzę zbliżała się do wartości 0,05.

Ta części pracy jest wykonana mniej starannie. Brakuje: (i) jednego schematu oznaczania istotności statystycznej otrzymanego wyniku w zależności od wartości *p*, (ii) prawidłowej numeracji tabel przy interpretacji wyników (Tab. 2 zamiast Tab. 8), (iii) nie zawsze wartości *p* wymienione w opisie wyników pokrywają się z danymi w opisie legendy tabeli (Tabela 11), (iv) na Rycinach 13 - 18 brakuje opisu osi OY, w kontekście badanego parametru, oraz (v) na Rycinie 14 C, nie zaznaczono istotności statystycznej, pomimo informacji sugerującej taką zależność pomiędzy badanymi parametrami.

In vitro

Testując VEH i PRO w hodowli powinno się udokumentować, że testowane stężenia nie zmieniały żywotności śródbłónka. W opisie metod jest wzmianka o wykorzystaniu testu z trypanem blue, ale nie ma precyzyjnej informacji, w jakim eksperymencie został on wykorzystany. Nie jest precyzyjnie przedstawione, czy oceniane parametry hemostazy w warunkach *in vitro* dotyczą medium hodowlanego, czy dotyczą lizatów komórkowych (metodyka sugeruje lizaty komórkowe). Nie zależnie, czy stężenia badanych parametrów są oceniane w medium hodowlanym, czy w lizatach komórkowych, wyniki powinny zostać przeliczone na stężenie białka komórkowego, ocenianego dla każdej studzienki, aby uniknąć złej interpretacji związanej z mniejszą lub większą liczbą komórek. Należałoby podać precyzyjnie, w czym była inkubowana grupa kontrolna oraz jakie było stężenia *vehiculum* (VEH) dodawanego do medium hodowlanego. Wykresy byłyby bardziej precyzyjne, gdyby pojawiła się na nich również istotność w stosunku do grupy kontrolnej, a nie tylko grupy z *vehiculum* (Rycina 16 - 18). Trochę szkoda, że w warunkach *in vitro* oceniono tylko parametry zaangażowane w proces fibrynolizy, a nie oceniono również parametrów zaangażowanych w proces krzepnięcia będących udziałem śródbłónka oraz czynników wazoaktywnych jak tlenek azotu, czy endotelina-1. W opisie wykresów nie podano z ilu niezależnych eksperymentów pochodzą uzyskane wyniki.

Dyskusja i omówienie

Bardzo dobrym pomysłem Doktorantki był podział rozdziału dyskusja na podrozdziały, co ułatwia poruszanie się w obszernym tekście. Również zamieszczona na końcu rycina w ładny i obrazowy sposób zawiera wszystkie wyniki dotyczące wpływu propofolu na proces hemostazy. Szkoda, że zabrakło przy niej opisu skrótów obecnych na rysunku. Każdy z uzyskanych wyników jest przedyskutowany w osobnych akapitach. Wiele elementów dyskusji odnosi się do wpływu propofolu na produkcję tlenu azotu, co jeszcze bardziej budzi niedosyt recenzenta, że ten parametr nie został oceniony. Często pojawiają się dane w odniesieniu do zdrowych szczurów, które Doktorantka miała możliwość również zbadać, ale z jakiejś przyczyny z tego zrezygnowała. Bardzo ważnym aspektem dyskusji jest udokumentowanie uzyskanych wyników i wytłumaczenie ich mechanizmów przez własne obserwacje bądź opublikowane przez Doktorantkę prace.

Trudno mi się zgodzić z jedną analizą porównawczą w tym fragmencie dysertacji. Doktorantka porównuje wielkości zakrzepu po infuzji propofolu u szczurów z nadciśnieniem z masą zakrzepów uzyskaną przez innych badaczy, u szczurów normotensyjnych. Wartości te są zdecydowanie mniejsze niż uzyskane przez Doktorantkę. Chociaż wartości liczbowe dają nam przesłanki, aby tak twierdzić, to trzeba zachować pewną ostrożność w interpretacji. Mamy trzy czynniki modyfikujące tworzenie skrzepliny: ciśnienie krwi, stosowanie leku oraz warunki eksperymentu. Można wyciągnąć takie wnioski tylko wtedy, gdy badania na obu grupach (z nadciśnieniem i bez) po infuzji propofolu, będą wykonywane w tych samych warunkach eksperymentalnych.

Dyskusję wraz z omówieniem oceniam najwyżej. Jest lapidarnie napisana. W przystępny i dojrzały sposób komentuje uzyskane wyniki. Doktorantka udowodniła w niej, że jest sprawnym badaczem i swobodnie porusza się po skomplikowanych mechanizmach procesu hemostazy.

Wnioski

Wnioski, w liczbie 5, wynikają z uzyskanych wyników, ale też częściowo bazują na danych literaturowych (wniosek 1). Odpowiadają na postawione wcześniej przez Doktorantkę pytania badawcze. Mają duże znaczenie praktyczne, zwłaszcza wniosek 2 i 4. Nie wiem czy, fortunnym jest we wniosku 1, nazwanie efektu działania propofolu na hemostazę działaniem plejotropowym. Plejotropia to działanie wielokierunkowe danego leku na różne procesy fizjologiczne. Pojęcie hemostazy obejmuje wpływ leku na naczynia, płytki i osoczowe czynniki krzepnięcia i dotyczy jednego zagadnienia, chociaż z udziałem trzech ważnych składowych. Użycie słowa w „zdrowiu”, to stwierdzenie bazujące na danych literaturowych, a niebędące wynikiem badań Doktorantki, ponieważ badała tylko wpływ propofolu u zwierząt z nadciśnieniem, a nie u zdrowych osobników. Stwierdzenie to w odniesieniu do zdrowych komórek HUVEC jest dużym uproszczeniem.

Streszczenie

Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim zostały napisane poprawnie i zawierają najistotniejsze wyniki z przeprowadzonych badań *in vitro* i *in vivo*.

Piśmiennictwo

Doktorantka cytuje publikacje według kolejności cytowań. Literatura w liczbie 230 jest w większości obcojęzyczne. Niewielka część piśmiennictwa to prace

opublikowane w ostatnich 5 latach (10%). Nie ma jednorodnego schematu przedstawiania pozycji literaturowych. W niektórych jest rok, wolumin oraz strony, niektóre zawierają również numer zeszytu, miesiąc wydania oraz numerację doi. W niektórych pominięto rok publikacji. W tekście pracy pojawiają się dwa rodzaje numeracji. Pomimo pewnego chaosu publikacje zostały starannie dobrane do omawianych zagadnień.

Podsumowanie recenzji

Doktorantka w przedstawionej pracy przedstawiła wyniki badań leku propofolu na proces hemostazy. Powodem wykonania tych badań były niejednoznaczne dane literaturowe, w których pojawiają się rozbieżności ze względu na różnorodne modele badawcze, stany patologiczne, w których do znieczulenia wykorzystywano propofol, oraz leki stosowane w okresie okołoperacyjnym. Podjęcie tego rodzaju badań jest ważne tym bardziej, że propofol obok etomidatu jest najczęściej stosowany lekiem do znieczulenia ogólnego. Praca jest dobrze zaplanowana i udokumentowana badaniami *in vivo*. Wydaje się jednak, że przy tak dużej pracy badawczej ze zwierzętami laboratoryjnymi można by również wykonać eksperymenty na szczurach normotensyjnych (zdrowych). Rozumiem ideę badań tylko na grupie z wyidukowanym nadciśnieniem, ponieważ doktorantka wspomina, że propofol jest wykorzystywany do zabiegów kardiochirurgicznych i naczyniowych u pacjentów wysokiego ryzyka powikłań zakrzepowo – zatorowych. Należy jednak pamiętać, że poza tym jest lekiem do znieczulenia ogólnego, również w chirurgii jednego dnia, lekiem uspokajającym podczas wentylacji respiratorem, ponadto wywołującym sedację podczas zabiegów diagnostycznych lub chirurgicznych. Wszechstronność zastosowań sprawia, że nie zawsze będzie on stosowany u osób z chorobami sercowo-naczyniowymi, a doktorantka miała dobrą okazję, aby sprawdzić jego wpływ w grupie szczurów bez zaburzeń krążeniowych. Recenzent chętni się dowie, dlaczego badania *in vitro* nie zostały wzbogacone o badania procesu krzepnięcia, którego udziałem jest śródbłonek. Brak zmian w aPTT, PT, stężeniu fibrynogenu oraz potencjale koagulacyjnym, wskazuje na brak wpływu propofolu na osoczowe czynniki krzepnięcia, ale nie dokumentuje jego wpływu na potencjał koagulacyjny śródbłonka. Szkoda, że w warunkach hodowli *in vitro* nie oceniono również stężenia hipotensyjnego i przeciwpytkowego tlenku azotu i jego antagonisty endoteliny-1. Badania te pozwoliłyby lepiej zinterpretować hipotensyjne działanie propofolu. Komórki śródbłonka z żyły pępowinowej są uniwersalnym materiałem badawczym,

jednak istnieje zawsze ryzyko błędnej interpretacji, gdy porównuje się ludzki śródbłonek w układzie *in vitro* oraz szczurzy model eksperymentalny. Trafnym stwierdzeniem Doktorantki w dyskusji było: „Dla większej spójności wyników należałoby wyizolować komórki z naczyń szczurów z 2K-1C i w takich warunkach prowadzić eksperyment”.

Pewnym mankamentem pracy jest brak dokładnego udokumentowania badań statystycznych i umieszczenia ich w tabelach i rycinach.

Niemiała funkcją recenzenta jest też zwrócenie uwagi na pewne potknięcia językowe np. (i) nieprecyzyjne określenie takie jak poziom zamiast stężenie, (ii) ilość leukocytów zamiast liczba leukocytów. (iii) sformułowania „lek łatwo sterowny, ale przez to wrażliwy na zmiany patologiczne w organizmie”, (iv) częstotści serca (HR) zamiast częstotść rytmu serca, czy (v) sformułowanie: „propofol obniżył umiarkowanie, choć istotnie, adhezję płytek krwi do kolagenu”. Pojawia się również pewna niekonsekwencja w podawaniu odpowiedników w języku angielskim dla niektórych skrótów lub pojęć.

Wniosek końcowy

Całość rozprawy doktorskiej, poza wcześniej skomentowanymi uwagami, wskazuje na dobre opanowanie warsztatu naukowego przez Autorkę. Przedstawioną pracę, zwłaszcza jej część *in vivo*, oceniam bardzo dobrze. Dobry plan oraz szeroki zakres wykonanych badań sprawia, że stworzony model badawczy *in vivo* dalej może być rozwijany i wykorzystywany w ocenie ingerencji leków na proces hemostazy u zwierząt z wyidukowanym nadciśnieniem tętniczym. Reasumując praca doktorska mgr Wiolety Kisiel spełnia kryteria stawiane dysertacji doktorskiej na stopień doktora nauk medycznych. Doktorantka jest dojrzałym badaczem umiejącym zaplanować badania, ale również krytycznie je skomentować. We właściwy sposób dochodzi do ważnych konkluzji.

Na podstawie dokonanej powyżej pozytywnej oceny, zwracam się do Pana Dziekana Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o przedłożenie Radzie Wydziału wniosku o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 26.03.2018

Dr hab.
Katarzyna Korybalska


Katarzyna Korybalska