

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. Roberta Paślawskiego pt. „Ocena przydatności badania elastograficznego SSI do rozpoznawania wczesnych zmian elastyczności tętnic obwodowych pod wpływem diety typowej dla krajów wysoko rozwiniętych (western diet) u świń”.

Mam przyjemność recenzować kolejną pracę doktorską, która wykonana została w ramach projektu „WroVasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo – Naczyniowej”, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego i realizowanego w Ośrodku Badawczo – Rozwojowym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu. Praca ta jest kolejnym przykładem owocnej współpracy specjalistów medycyny ludzkiej ze specjalistami medycyny weterynaryjnej. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Andrzej Szuba, specjalista chorób wewnętrznych, wybitny przedstawiciel nauk medycznych, kierownik Kliniki Chorób Wewnętrznych Wojskowego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu.

Ze względu na specyfikę tej rozprawy doktorskiej i jej znaczenia nie tylko dla nauk weterynaryjnych ale także nauk medycznych Wydział Lekarski Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu podjął uchwałę o otwarciu przewodu doktorskiego z możliwością nadania lek. wet. R. Paślawskiemu stopnia doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska napisana została na 70 stronach wydruku komputerowego i składa się ze wstępu, celu pracy, materiału i metod, wyników, dyskusji pięciu wniosków, streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim oraz wykazu 111 pozycji piśmiennictwa związanego ściśle z tematyką pracy. Wstęp rozprawy poprzedzony jest spisem treści oraz czterostronicowym wykazem stosowanych w pracy skrótów.

Przedstawiona do oceny dysertacja lek. wet. R. Paślawskiego koncentruje się na bardzo aktualnym i nowatorskim problemie, a mianowicie na wykazaniu na modelu zwierzęcym przydatności metody badania elastograficznego SSI tętnic obwodowych świń do wczesnego wykrywania zmian elastyczności tych naczyń pod wpływem nieprawidłowej i nielimitowanej diety (western type diet), charakteryzującej się nadmiarem tłuszczów zwierzęcych, białka i cukrów. Skoncentrowanie się przez Autora tej pracy na metodzie badania elastograficznego SSI jako rodzaju elastografii SWE tętnic udowych zasługuje na szczególne uznanie, gdyż metoda ta stosowana jest u dopiero od 2010 roku.

Bardzo wartościowym elementem tej pracy jest również to, iż wraz z zastosowaniem nowoczesnej metodyki badania elastograficznego tętnic udowych świń Autor równolegle oznaczał szereg innych parametrów określających stan funkcjonalny układu sercowo –

naczyniowego, a także po zakończeniu dwunastomiesięcznego doświadczenia i po eutanazji zwierząt oceniał także zmiany morfologiczne, biochemiczne i fizyczne w ścianie izolowanych tętnic.

Trzystronicowy wstęp napisany został prawidłowo, koncentruje się na przeglądzie aktualnego, międzynarodowego piśmiennictwa, dotyczącym podjętej tematyki badawczej. Z poruszonej w nim problematyki jasno wynika uzasadnienie podjętych przez lek. wet. R. Paślawskiego badań, a także potwierdza teoretyczne przygotowanie Autora do przeprowadzenia zaplanowanych doświadczeń.

„Cel pracy” został sformułowany w postaci jednego punktu, choć jasno z niego wynika, że Autor oprócz opracowania samej metodyki badania elastograficznego SSI tętnic u świń, podejmuje próbę oceny przydatności tej metody dla wczesnego rozpoznawania zmian w elastyczności tych naczyń, zachodzących pod wpływem nieprawidłowej i nielimitowanej diety. Autor w „celu pracy” nie uwzględnił zamiaru przeprowadzenia oceny porównawczej wyników badań elastograficznych SSI tętnic z wynikami innych stosowanych metod diagnostycznych oceniających stan funkcjonalny układu sercowo – naczyniowego u świń, a także z wynikami oceny strukturalnej ścian tętnic przeprowadzonej post mortem, a co w pracy doktorskiej zostało przez Autora wykonane.

Tak rozumiany „cel pracy” ma pełne odzwierciedlenie w pięciu wnioskach wynikających z otrzymanych wyników.

„Materiał i metody” przedstawione zostały na 17 stronach wydruku komputerowego wraz z 9 rycinami. W rozdziale tym opisane są grupy świń (kontrolna i doświadczalne – „Dieta” i „Regresja”), sposób ich karmienia, sposób co trzymiesięcznego postępowania przy badaniach klinicznych i dodatkowych, aż do czasu zakończenia doświadczenia po 12 miesiącach. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres badań jakie Autor wykonywał obok głównego badania jakim było badanie elastograficzne SSI tętnic udowych. A mianowicie wykonywał badania morfologiczne i biochemiczne krwi ze szczególnym uwzględnieniem stężenia cholesterolu całkowitego, triglicerydów i cholesterolu we frakcji HDL i LDL, a także badania elektrokardiograficzne, echokardiograficzne, ultrasonograficzne, badanie tętnic szyjnych i udowych ze szczególnym uwzględnieniem badania przepływu krwi metodą Dopplera fali pulsacyjnej, pomiarami grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy udowej i oceny siedmiu wskaźników automatycznej detekcji ruchu ścian tętnic. Po eutanazji zwierząt i po izolacji tętnic udowych wykonywał badania histopatologiczne tych naczyń, a także oznaczał stężenie kolagenu typu I, III, IV i elastyny oraz wykonywał kompleksowe badania określające właściwości mechaniczne tętnic na podstawie pomiarów współczynników mechanicznych, takich jak naprężenie Lagrangian’a, odkształcenie Green’a, naprężenie Cauchy’ego oraz obwodowy moduł ścieczny i styczny.

Monitoring przyrostu podskórnej tkanki tłuszczowej przeprowadził Autor powszechnie uznaną metodą ultrasonograficzną.

Zastosowane metody diagnostyczne, jak i sposób wykonywania pomiarów przez Autora nie budzą zastrzeżeń. Pomiary wykonane zostały na nowoczesnej aparaturze diagnostycznej. Na podkreślenie zasługuje także fakt, że dla wiarygodności otrzymywanych wyników niektóre z parametrów Autor oznaczał trzykrotnie, uśredniając wyniki, a także w celu udowodnienia odtwarzalności wyników te same pomiary wykonywane były nie tylko przez Autora, ale także przez drugą, kompetentną osobę, co przedstawione zostało w tabeli 13.

Analiza statystyczna przeprowadzona została za pomocą prawidłowych testów, pozwalających na właściwą interpretację otrzymanych wyników.

Rozdział „wyniki” opracowany został na 16 stronach wydruku komputerowego i głównie składa się z 19 tabel zawierających wyniki z przeprowadzonych doświadczeń oraz z krótkiego ich opisu.

Dyskusja otrzymanych wyników w kontekście danych dostępnych w międzynarodowym piśmiennictwie przeprowadzona została na 7 kolejnych stronach w sposób prawidłowy.

Zarówno we wstępie, materiałach i metodach, jak i dyskusji cytowane są 93 pozycje piśmiennictwa anglojęzycznego i 8 pozycji w języku polskim, głównie w oparciu o prace oryginalne.

Po przeczytaniu pracy nasuwają się jednak pewne uwagi, do których chciałbym aby lek. wet. Robert Paślawski ustosunkował się podczas publicznej obrony.

1. Dlaczego przy omawianiu wyników Autor posługuje się głównie kolejnością badań tzn. 0, 1, 2, 3, 4, a nie miesiącami kiedy przeprowadzał badania t.j. w terminie 0, a następnie 3, 6, 9 i 12 miesiąca? Stąd też pojawiają się wątpliwości np. na stronie 19 cyt. „w 2 badaniu okresowym tj. po trzymiesięcznym stosowaniu diety u grupy „Dieta” i „Regresja””. W moim odczuciu jest to po 6 miesiącach bez uwzględnienia dwóch grup doświadczalnych. W tabeli 4 brakuje wyników z nr badania 0.
2. Jak rozumieć zapis na str. 15 cyt. „doszło do upadku dwóch świń po jednej z grupy „Dieta” i „Regresja””? Czy oznacza to, że średnie arytmetyczne w tabelach odnoszące się do 9-tego miesiąca doświadczenia w grupie doświadczalnej są średnimi z 18 zwierząt, a po 12 miesiącach średnimi z 9 zwierząt w grupie „Dieta” i 9 w grupie „Regresja”? Na początku rozdziału „materiały i metody” str. 14 Autor napisał, że grupy doświadczalne liczą po 10 świń.
3. Jak Autor ustosunkuje się do nieprzeprowadzonego po 3, 6, 9 i 12 miesiącach monitoringu stężenia glukozy i amoniaku we krwi, w kontekście stosowanej „western type diet”, charakteryzującej się m. in. podwyższoną o 13% zawartością białka i 4% dodatkiem sacharozy? Dlatego też nie rozumiem w „dyskusji” na str. 47 sformułowania cyt. „u świń żywionych dietą typu „western” nie zaobserwowano zaburzeń gospodarki węglowodanowej”.
Oznaczanie stężenia amoniaku z kolei byłoby dobrym wskaźnikiem oceny funkcji detoksykacyjnej wątroby przy tak dużej podaży białka w diecie.
Monitoring ryzyka zmian sercowo – naczyniowych wskutek podawania w „western type diet” 5-krotnie wyższej zawartości tłuszczu zwierzęcego na podstawie oznaczania w surowicy stężenia cholesterolu, cholesterolu HDL i LDL oraz triglicerydów w 6 i 12 miesiącu doświadczenia przeprowadzony został bez zastrzeżeń.
4. Czy Autor uważa, że nie potrzebny jest chociażby w dyskusji komentarz o ilości zjadanej dziennie paszy przez świnię z grupy kontrolnej wraz z informacjami o przyroście masy ciała i sposobie trzymania zwierząt w kontekście limitowanego dostępu do paszy?
5. Wyjaśnienia wymagają nieścisłości wynikające z tabel 1, 2 i 3, i z opisu na str. 47, cyt. „badanie kliniczne wykazało wyższą masę ciała i wyższe stężenie cholesterolu”. Nie stwierdzono przecież istotnego wzrostu masy ciała ani stężenia cholesterolu między grupami, a wzrost masy ciała w obu grupach wynikał z fizjologicznego przyrostu masy ciała. Ponadto w dyskusji przytoczono numery tabel niezgodne z treścią.

6. Tabela 1 nie przedstawia wyników „częstości akcji serca” jak napisano na stronie 31 gdyż wyniki te przedstawił Autor w tabeli 6.
7. Brak jest informacji kiedy wykonano metodą ultrasonograficzną pomiary grubości podskórnej tkanki tłuszczowej w miejscach „łopatka”, „żebra”, „łędźwie”? Ciekawa byłaby analiza dotycząca narastania grubości tkanki tłuszczowej w czasie doświadczenia w kontekście zmian w wartościach innych parametrów, jak i w kontekście niemożliwości ultrasonograficznego badania tętnic szyjnych.
8. Jak Autor zinterpretuje opis pod tabelą 5, w której zamieszczone są wyniki sześciu parametrów EKG cyt. „nie stwierdzono istotnych statystycznych różnic między grupami (...) z wyjątkiem gdzie częstość akcji serca jest istotnie niższa”? To znaczy, że w tabeli 5 są różnice istotne statystycznie w parametrach EKG między badaniami 3 i 4, czy tych różnic nie ma? Na stronie 48 w „dyskusji” napisał Autor, że nie stwierdzono różnic między grupami w parametrach EKG.
9. Czy w opisie tabeli 6 nie powinna być gwiazdka stwierdzająca istotne różnice w częstości akcji serca między badaniami 4 i 3?
10. Na stronach 34-36 w tabelach 6 i 7 przy zestawieniu wyników 9 parametrów badania echokardiograficznego brak jest informacji, że nie stwierdzono istotnych różnic w poszczególnych parametrach między grupą kontrolną i doświadczalnymi.
11. Na stronie 26, Autor cytuje za Stary HC 2000 8-stopniową skalę zmian miażdżycowych w ścianie naczyń, a dalej ogranicza się do opisu tylko 6 stopni tej skali.
Brak jest w poszczególnych rozdziałach pracy szczegółowego opisu i interpretacji zmian histopatologicznych zachodzących w ścianie tętnic udowych pozwalających na stwierdzenie (str. 44), że obecne są blaszki miażdżycowe I° i II°. Autor nie nawiązał do załączonych na str. 27 fotografii z obrazu mikroskopowego.
12. Na stronie 36 i pod tabelą 8 dwukrotnie opisano stosowane skróty poszczególnych parametrów fali pulsacyjnej. Szkoda, że Autor w rozdziale „wyniki” nie zamieścił na przykład następującego opisu: „Na podstawie przeprowadzonych pomiarów fali pulsacyjnej metodą Dopplera w tętnicy udowej stwierdzono istotny wzrost zarówno prędkości szczytowoskurczowej jak i prędkości końcoworozkurczowej u świń grupy „Dieta” w 6 i 9 miesiącu żywienia „western type diet”, w porównaniu z wartościami tych parametrów oznaczanych u zwierząt grupy kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych różnic między grupami po 12 miesiącach doświadczenia”. Autor nie podjął komentarza tego zjawiska w dyskusji.
13. Analizując wyniki zamieszczone w tabeli 9 brak jest interpretacji w dalszej części pracy dlaczego przerwanie podawania diety „western” po 9 miesiącach, powoduje istotny spadek po kolejnych trzech miesiącach (grupa „Regresja”) wartości pomiaru grubości błony środkowej i wewnętrznej tętnicy udowej (intima media IMT) poniżej wartości otrzymywanych w grupie świń kontrolnych?
14. Autor nie opisał w sposób przejrzysty wyników zamieszczonych w tabelach 10 i 11. Z wyników zamieszczonych w tabeli 10 wynika iż po 3 miesiącach badań (nr badania 1) stwierdzono istotnie mniejszą średnicę tętnic udowych (D_{max} i D_{min}) u świń karmionych dietą „western” w porównaniu do świń grupy kontrolnej. Średnica ta była także istotnie mniejsza w 6 i 9 miesiącu badania (nr badania 2 i 3). W 12 miesiącu badania nie stwierdzono natomiast istotnych różnic między grupami.

W tabeli 11 Autor wykazał, iż w 9 miesiącu badań stwierdzono istotny spadek wartości parametru podatności ściany naczyń oznaczony metodą automatycznej detekcji ruchu ścian tętnic (c Tracking) u świń z grupy „Dieta” w porównaniu z grupą kontrolną. Po 12 miesiącach tj. po 3 miesiącach zaprzestania podawania diety „western” (grupa „Regresja”) podatność ścian naczyń była istotnie niższa w porównaniu z grupą „Dieta”. Natomiast średnica tętnic udowych po 12 miesiącach nie różniła się istotnie między grupami. Oczekuję od Autora interpretacji tych wyników.

Dlaczego przy omawianiu wyników zamieszczonych w tabeli 11 (str. 40) wymieniony jest parametr wskaźnik pulsacji – PI? Brak jest także oznaczenia w tabeli 11 istotnych różnic między grupami kontrolnymi w badaniu 3 i 4 w takich parametrach jak wskaźnik sztywności ścian tętnic beta i jednopunktowa prędkość fali tętna.

15. Jak Autor zinterpretuje oznaczenia istotności w tabeli 12, z opisem tej tabeli? Wydaje mi się, że jest tutaj wiele nieścisłości. Ponadto w „wykazie skrótów” brak jest opisu skrótu kPa, jako jednostki określającej w tym przypadku siłę naprężenia, a są tak podstawowe jak kg, l, wit. A, wit. B itp.
16. W tabeli 13 za bardzo wartościowe uważam zestawienie wyników parametrów oznaczonych przez dwóch niezależnych badaczy i poddanie tych wyników analizie statystycznej, co w znaczącym stopniu podnosi wiarygodność stosowanych metodyk badawczych. W „materiałach i metodach” nie znalazła się informacja, że niektóre pomiary wykonywane będą przez dwóch badaczy uprzednio przygotowanych do tych badań. Nie rozumiem ponadto dlaczego tabela 13 znajduje się w części oznaczonej 5.7, kiedy to w tabeli 13 są również parametry opisane w części 5.6. Czy tabela 13 nie powinna być w oddzielnym rozdziale wyników? Brak jest jasności co do zastosowanych przez Autora w tabeli 13 skrótów ADV i VTI (brak w wykazie skrótów) oraz MnV i RI (brak w dotychczasowych tabelach).
17. Brak jest opisu tabeli 19 z której wynika, że w pięciu badanych parametrach nie wykazano istotnych różnic między badanymi grupami świń. Należałoby doprecyzować nazewnictwo, czy mówimy o obwodowym module (tabela 19), czy o odwodowym module siecznym (str. 30).
18. Doprecyzowania wymaga w dyskusji sformułowanie cyt. „w drugiej kontroli” str. 48. Przy odwołaniu się w tym miejscu do tabeli 10 łatwiej byłoby czytelnikowi zrozumieć te kwestie. Szkoda, że Autor opisując na tej samej stronie wskaźnik otrzymany przez podzielenie średnicy naczynia przez masę ciała nie opisał go wcześniej w „materiałach i metodach” i „wynikach”. Ponadto nie mogę zorientować się czy wskaźnik ten jest autorstwa Doktoranta, czy był on już wcześniej opisywany w piśmiennictwie.
19. Na jakiej podstawie oparto na stronie 49 stwierdzenie cyt. „przeprowadzone badanie nie wykazało podobnej zależności u świń” tzn. związku pomiędzy wzrostem stężenia cholesterolu i cholesterolu LDL oraz HDL, a wzrostem parametru grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej (IMT)? W „dyskusji” brak jest odniesienia do otrzymanych wyników zamieszczonych w tabelach 9 i 2.
20. Nie rozumiem dlaczego na stronie 50 stwierdzono cyt. „nie wykazano istotnych różnic podatności ścian naczyń (AC)” a przecież w tabeli 11 stwierdzono istotne różnice? Nie znalazłem w rozdziale wyniki omówienia korelacji pomiędzy parametrami podatności ścian naczyń (AC), a parametrami grubości błony środkowej i wewnętrznej tętnic

udowych (IMT). Na tej samej stronie napisano cyt. „grupa „Regresja” miała najwyższe wartości PSV i EDV”. Czy to znaczy, że istotnie statystycznie? Jednakże w moim odczuciu wyniki zamieszczone w tabeli 8 parametrów prędkości szczytowskurczowej i prędkości końcoworozkurczowej tego nie potwierdzają.

21. Na stronie 52 cytowana jest praca Ramnarine i wsp. 2014 podkreślająca nowatorskość planowanych przez lek. wet. R. Pasławskiego badań elastograficznych SSI tętnic. Szkoda, że praca ta nie jest cytowana we wstępie (str. 12). Cytowana jest natomiast we wstępie (str. 12), a także w streszczeniu (str. 55) praca Garrarda i Ramnarine 2013, której z kolei nie ma w wykazie piśmiennictwa.
22. Autor nie uzasadnił w „materiałach i metodach” celowości badania grupy „Regresja”, a uczynił to pod koniec dyskusji na stronach 52 i 53, wskazując na możliwość transportu zwrotnego cholesterolu.
23. W pełni zgadzam się ze stwierdzeniem zawartym we wnioskach, że stosując nowatorską metodę elastografii SSI można wcześniej wykryć zmiany niż metodami c-Tracking lub ultrasonograficznym pomiarem grubości kompleksu intima media (IMT). Nieprawidłowe jest sformułowanie cyt. „że po 3 miesiącach”. Według mojej oceny to po 6 miesiącach można wykryć zmiany w tętnicy udowej stosując metodę elastografii SSI, natomiast innymi wyżej wymienionymi metodami dopiero po 9 miesiącach.
24. Analizując aspekt edytorski pracy zauważyć należy drobne literówki, błędy językowe, a także brak konsekwencji w pisaniu niektórych wyrazów np. w jednym miejscu razem, w innym oddzielnie. Nieprecyzyjnie wykonano numerację rycin. Dwukrotnie oznaczono tą samą cyfrą w „materiałach i metodach” dwie ryciny (nr ryc. 7 str. 25 i 27). Brak jest także ujednoliconego zapisu grup „Dieta” i „Regresja”. Usterki te zapewne zostaną usunięte przy przygotowywaniu pracy do publikacji i nie będą miały znaczenia przy publikowaniu tych wyników w pracy w języku angielskim.

Podsumowując przedstawioną do oceny pracę doktorską lek. wet. R. Pasławskiego stwierdzam, że praca ta spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 ze zm.). Nowatorski charakter tej pracy w pełni uzasadnia nadanie lek. wet. Robertowi Pasławskiemu stopnia doktora nauk medycznych w dziedzinie biologia medyczna.

