Katowice, 29/06/2023

dr hab. n. med. Łukasz Bułdak
Klinika Chorób Wewnętrznych
i Farmakologii Klinicznej
Śląski Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych Pani mgr Małgorzaty Maraj pt.: "Wpływ podawania rywaroksabanu na rozwój i przebieg eksperymentalnego ostrego zapalenia trzustki"
wykonanej w Katedrze Fizjologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Przedstawiona do recenzji praca doświadczalna porusza ważny problem zdrowotny jakim jest ostre zapalenie trzustki. Jej podstawowym celem jest ocena wpływu rywaroksabanu, leku należącego do nowych doustnych leków przeciwkrzepliwych, na przebieg indukowanego ostrego zapalenia trzustki (OZT) u zwierząt laboratoryjnych. Tematyka wydaje się bardzo aktualna z punktu widzenia klinicznego. Polska należy do krajów o wysokiej zapadalności na OZT, a jest to choroba o licznych powikłaniach i potencjalnie śmiertelnym przebiegu. Aktualnie w leczeniu OZT dominuje postępowanie objawowe obejmujące leczenie przeciwbólowe, płynoterapię, leczenie żywieniowe, antybiotykoterapię, a niekiedy również zabiegowe. Nie dysponujemy celowaną farmakoterapią uderzającą w patofizjologię OZT. Zadanie to jest niełatwe ze względu na złożoną etiologię tej choroby. Od wielu lat czynione są jednak w tym kierunku starania. O trudnościach z tym związanych świadczy historia leksipafantu. Dlatego próba zaadaptowania dostępnych leków, które wpływają na procesy zaangażowane w przebieg OZT, która w tym wypadku dotyczy nadmiernej krzepliwości i zapalenia, wydaje się uzasadniona.

Dysertacja cechuje się wysoką starannością edytorską i ma typowy dla rozpraw doktorskich układ. Manuskrypt zamieszczono na 104 stronach, zawiera on 22 ryciny i 2 tabele.

Po starannie przygotowanym spisie treści zamieszczono wykaz użytych skrótów, który adekwatnie opisuje ich znaczenie. Wśród wymienionych znalazłem jeden niewielki błąd w rozwinięciu: "P-VASP – ang. phosphorylated vasodilator-stimulated", w którym najprawdopodobniej brakuje na końcu słowa "phosphoprotein".

Na kolejnych stronach, we wstępie, doktorantka umiejętnie, w sposób stopniowy i klarowny wprowadza czytelnika w zagadnienia OZT, podając jego epidemiologię, przyczyny, w tym udział stresu oksydacyjnego oraz zmian zakrzepowych wikłających zapalenie. Następnie opisuje rywaroksaban, wskazując na jego potencjalne działanie przeciwzapalne. W ostatnich akapitach przedstawia eksperymentalne modele wywoływania OZT. I na tej kanwie wydaje się rysować schemat swojego eksperymentu. Płynnie przechodzi pomiędzy zagadnieniami klinicznymi a doświadczalnymi, pokazując ich silne związki. Niestety pojawiają się pojedyncze makaronizmy "szok" zamiast wstrząs, "ischemia" zamiast niedokrwienie, "komplement" zamiast dopełniacz, ponadto zwraca uwagę powtarzające się wykorzystanie słowa "poziom" zamiast stężenie/aktywność.

Doktorantka podała pięć celów badawczych, na które chciała znaleźć odpowiedź wykorzystując model badawczy OZT u szczurów. Cele te są jasno sprecyzowane. Jednak cel 5: "Badania pozwolą na określenie stopnia przydatności rywaroksabanu w terapii OZT – czy jego zastosowanie znajduje uzasadnienie w sytuacjach klinicznych. Wieloparametrowa ocena stanu trzustki pozwoli na określenie ewentualnych przeciwwskazań do stosowania rywaroksabanu w tym schorzeniu" wydaje się niezwykle ambitny.

W dalszej części dysertacji znalazł się opis metodyki. Uzyskano zgodę odpowiedniej komisji bioetycznej, a jako zwierzęta doświadczalne wybrano szczury Wistar. Do indukowania OZT wykorzystano dootrzewnowo podawaną ceruleinę. Doktorantka opisała sposób przeprowadzenia eksperymentów i podział na grupy badawcze, jednak w mojej ocenie brakuje tu schematu, który w sposób przejrzysty pokazałby sposób przeprowadzenia doświadczeń - to jest 31 grup po 8 osobników. Będzie to wartością dodaną przy przygotowaniu pracy do publikacji w recenzowanych czasopismach. Nie jest również jednoznacznie przedstawiony zakres "operacji pozorowanej" - z treści całego dokumentu wnioskuję, że chodzi o wstrzyknięcie dootrzewnowe soli fizjologicznej zamiast ceruleiny. Brak jest informacji na temat dostawcy/producenta/źródła rywaroksabanu oraz uzasadnienia dla wyboru dawek 5/20/100 mg/kg masy ciała. Wyjaśnienia wymaga rodzaj materiału biologicznego wykorzystany do oznaczania wybranych zmiennych. Z opisu pobierania krwi z żyły wynika, że krew pobierano na antykoagulant, a stężenie amylazy i lipazy oznaczane było w surowicy. W sferze edytorskiej korekty wymaga zapis liczb, tj. z "," a nie "." oraz stwierdzenia "potraktowane" zamiast np. poddane działaniu i "randomowo" zamiast np. losowo.

Sekcja przedstawiająca zagadnienia statystyczne nie zawiera informacji w jaki sposób potwierdzono, że rozkłady zmiennych w analizowanych grupach są normalne.

Główna część dysertacji zawiera wyniki uzyskanych doświadczeń. Są one klarownie zebrane na rycinach, natomiast w treści w większości nie zamieszczono bezpośrednich danych liczbowych na temat średnich i odchyleń (SEM). Konsekwentnie, zgodnie z założeniami autorka opisuje wyniki działania rywaroksabanu stosowanego przed indukcją OZT, jak i po jego wystąpieniu. Autorka jasno przedstawia zależności pomiędzy uzyskanymi wynikami, natomiast niestety wielokrotnie powtarza się zapis o różnicy pomiędzy wynikami - vide wyniki INR - choć brak jest pokazanej znamienności statystycznej na rycinie. W podrozdziałach dotyczących analizy histologicznej nie zamieszczono w ogóle danych z porównań statystycznych, choć znajdują się tam stwierdzenia takie jak: "Dawka rywaroksabanu 20 mg/kg/dzień w porównaniu do pozostałych dawek skuteczniej ograniczała rozległość nacieczeń zapalnych – obejmowały one tylko naczynia krwionośne i nie miały charakteru rozlanego". Jaką metodą i w jaki sposób porównywano dane uzyskane w tabelach? W przypadku niektórych porównań łatwo jest zgubić wątek: "Dawka rywaroksabanu 100 mg/kg skutkowała niezmiennie wysokim poziomem aktywności obu enzymów (±10000 U/L dla amylazy i ±500 U/L dla lipazy). Ponadto, aktywność amylazy w surowicy nie tylko nie zmalała, ale była wyższa niż u zwierząt z zapaleniem trzustki, które nie otrzymywały leku. Ta różnica jednak nie była istotna statystycznie". Wymagać to będzie korekty na etapie przygotowania pracy do publikacji. Ryciny, na których oceniano efekty stosowania rywaroksabanu w kolejnych dniach mogłyby zyskać na klarowności przy wyborze liniowego formatu wykresu zamiast słupkowego.

Zwieńczeniem pracy jest dyskusja, w której doktorantka umiejętnie lokowała swoje wyniki na tle innych doniesień naukowych. Wśród drobnych nieścisłości uwagę moją zwróciło zdanie z pierwszego akapitu: "W naszym badaniu podawanie rywaroksabanu w dawkach 5 i 20 mg/kg przez 3 dni poprzedzające wywołanie OZT poprawiło trzustkowy przepływ krwi o około 20 % [Ryc. 8]". Analizując rycinę nie znalazłem tam informacji o różnicy z grupą SALINE, a tylko C. Ponadto stwierdzenie: "Nasze wyniki wskazują, że wcześniejsze podawanie rywaroksabanu zmniejsza poziom czynników krzepnięcia w surowicy i zmniejsza aktywację koagulacji [Ryc. 2]" również nie znajduje potwierdzenia w danych zawartych na rycinie 2, która przedstawia D-dimery, będące produktami degradacji fibryny a nie czynnikiem krzepnięcia. Ciekawym, acz tylko powierzchownie poruszonymi zagadnieniami są działania niepożądane rywaroksabanu w niniejszym badaniu (podbiegnięcia krwawe) - ich szersza analiza mogłaby pozwolić na wychwycenie ważnych zależności. W ostatnim akapicie słusznie wspomniano o ograniczeniach wykorzystanego modelu badawczego.

W mojej ocenie Doktorantce udało się zrealizować postawione cele pracy. W zakresie celu 5 Autorka starała się poszukiwać potencjalnego obszaru terapeutycznego dla profilaktycznego stosowania rywaroksabanu przed badaniem endoskopowym (ERCP). Jednak w mojej ocenie nie jest to rozwiązanie optymalne, co wynika z podwyższonego ryzyka krwawienia. Powyższe w żadnej mierze nie umniejsza w moich oczach zdolności analitycznej i dociekliwości Autorki, a moja uwaga wynika ze spojrzenia klinicznego.

Podsumowując, uważam że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Maraj **w pełni odpowiada wymogom** stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych zamieszczonym w Ustawie [art. 179 Ustawy z 3 lipca (Dz. U. 2018 poz. 1669 ze zm.)] i **wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Maraj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

dr hab. n. med.
Łukasz Bułdak
lekarz
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista farmakologii klinicznej
specjalista endokrynologii
2328773