

Dr hab. Wiktor Niewiadomski
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN
ul. Pawińskiego 5,
02-106 Warszawa
e-mail: wniewiadomski@imdik.pan.pl
tel. (22) 60 86 612

Warszawa, 5.09.2024

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr **Bogny Szoltys-Brzezowskiej** pt.: „**Zmiany powierzchni odleżyn oraz ekspresja genów wybranych metaloproteinaz i transformującego czynnika wzrostu w odleżynach u ludzi po zastosowaniu elektrostymulacji wysokonapięciowej**”

Na wstępie chcę wyrazić uznanie Pani Doktorantce za podjęcie tematu leczenia odleżyn. Jak pisze Ona w swojej rozprawie jest to powszechny problem pacjentów neurologicznych, osób starszych przebywających w placówkach opieki długoterminowej i pacjentów na oddziałach intensywnej terapii. Leczenie odleżyn jest czasochłonne, pracochłonne i długotrwałe, dlatego wszelkie skuteczne sposoby przyspieszenia tego leczenia powinny być weryfikowane i w przypadku wykazania ich istotnego wpływu na skuteczność leczenia powinny być stosowane.

Rozprawa obejmuje 106 stron i ma klasyczną budowę, zawiera: wykaz skrótów – bardzo przydatny, obszerne i ciekawe wprowadzenie, szczegółowo wymienione cele badania, metody, wyniki, dyskusję i streszczenie po polsku i angielsku. Na bibliografię składa się 253 pozycji literaturowych adekwatnych do podjętej tematyki badawczej.

Pierwszym celem badawczym Rozprawy jest zbadanie w jakim stopniu wspomaganie leczenia standardowego elektrostymulacją wysokonapięciową przyspiesza zmniejszanie się powierzchni odleżyny. Przyspieszenie gojenia się odleżyn pod wpływem elektrostymulacji zostało wykazane i opisane we wcześniejszych publikacjach. Jak zaznacza Autorka niniejszej rozprawy, nowością jest to, że zagadnienie to zostało zbadane w trybie randomizowanego kontrolowanego badania klinicznego, po angielsku nazywanego *randomized controlled trial* i oznaczanego skrótem RCT. Należy pamiętać, że tryb RCT jest „złotym standardem“ eksperymentów klinicznych, wykonywanych zgodnie z zasadami dobrej praktyki klinicznej. Nie wchodząc w szczegóły wymaganych w takim badaniu procedur, sensem ich zastosowania

jest uzyskanie jak największej wiarygodności wyników przez maksymalnie możliwą eliminację wpływu badaczy, często nieświadomego, na sposób prowadzenia badań i na ocenę wyników, wynikającego z ich oczekiwań co do spodziewanego rezultatu. Praca w trybie RCT oznacza konieczność wprowadzenia i ścisłego przestrzegania wymaganych procedur, co wiąże się z bardzo dużym nakładem pracy. Jednak dzięki temu otrzymane wyniki uzyskują pieczęć wiarygodności i mogą stać się podstawą praktyki medycznej.

Pani Doktorantka uzyskała, akceptowalne przez powszechną społeczność medyczną, wiarygodne wyniki świadczące o tym, że wspomaganie standardowego leczenia odleżyn elektrostymulacją wysokonapięciową istotnie przyspiesza zmniejszanie się powierzchni tych odleżyn. Obserwacją Autorka objęła okres 4 tygodni leczenia, wyniki obserwacji odnoszą się do pięciu punktów czasowych: przed rozpoczęciem leczenia i po kolejnych tygodniach leczenia. Zastosowała ona dwa rodzaje elektrostymulacji wysokonapięciowej: katodową to jest taką, gdy elektroda lecznicza, czyli ta umieszczona na odleżynie jest katodą i anodową, to jest taką, gdy elektroda lecznicza jest anodą. Procentowy ubytek powierzchni odleżyny po 4 tygodniach leczenia był największy, gdy leczenie standardowe wspomaganie było wysokonapięciową terapią katodową i wynosił on 55,4%. Ubytek ten był nieco mniejszy, wynosząc 49,34%, gdy zastosowano wysokonapięciową terapią anodową i najmniejszy, 25,45%, gdy leczenie standardowe nie było wspomaganie elektrostymulacją wysokonapięciową. Ubytki powierzchni odleżyny były statystycznie istotnie większe w grupach, w których stosowano elektrostymulację w porównaniu z grupą kontrolną.

Wyniki uzyskane przez Panią Doktorantkę stanowią w pewnym sensie posumowanie badań nad skutecznością elektrostymulacji wysokonapięciowej w leczeniu odleżyn. Równocześnie są podstawą do zastanowienia się, czy udowodnione korzyści stosowania elektrostymulacji uzasadniają jej wprowadzenie do praktyki medycznej. Dołączenie elektrostymulacji wysokonapięciowej do leczenia standardowego wiąże się z dodatkowym kosztem i pracą personelu medycznego. W omawianych w rozprawie badaniach elektrostymulacja była aplikowana przez 50 minut dziennie, przez 5 dni w tygodniu, przez 4 kolejne tygodnie. Sądzę, że kolejnym etapem badania tej formy terapii, uzasadnionym otrzymanymi przez Panią Doktorantkę wynikami, winno być poszukiwanie sposobu na zwiększanie skuteczności elektrostymulacji wysokonapięciowej.

Zadziwiające jest to, że działanie czysto fizyczne i do tego bardzo proste, tak znacząco wpłynęło na niezwykle złożony proces biologiczny jakim jest gojenie odleżyn. Myślę, że fascynującym zagadnieniem jest poznanie mechanizmu działania elektrostymulacji wysokonapięciowej na proces gojenia. We Wstępie niniejszej rozprawy Autorka podejmuje ten temat wspominając badania, które pokazały, że w kierunku anody przemieszczają się makrofagi i neutrofile, co prowadzi do reaktywacji autolizy tkanki martwiczej i fazy zapalnej, jednak do anody podążają także fibroblasty i komórki mięśni gładkich, co sprzyja angiogenezie i ziarninowaniu. Do katody podążają komórki nabłonka naczyń krwionośnych, fibroblasty i keratynocyty wzmagając procesy związane z fazą odbudowy tkanki. Jestem ciekaw, czy istnieje wyjaśnienie mechanizmu, powodującego przemieszczanie się wyżej wspomnianych rodzajów komórek w kierunku anody lub katody?

W tym kontekście chciałbym zwrócić uwagę na pokazanej w rozprawie większą skuteczność elektrostymulacji katodowej aniżeli elektrostymulacji anodowej. Co prawda, przewaga skuteczności elektrostymulacji katodowej nad stymulacją anodową nie osiągnęła istotności statystycznej, to znaczy mogła być dziełem przypadku, ale też mogła być wyrazem faktycznie większej skuteczności elektrostymulacji katodowej.

Jest możliwe, że potencjał elektrostymulacji wysokonapięciowej w leczeniu odleżyn jest znacznie większy, aniżeli wykazany w tej Rozprawie. Może być nawet tak, że sięganie po tę formę terapii może być nieodzowne, gdyż jej zastosowanie jest krytyczne dla osiągnięcia pożądanego skutku. O takiej sytuacji wspomina Pani Doktorantka, przytaczając pracę Kloth i Feedar, opublikowaną w 1988 roku, w której elektrostymulacja wysokonapięciowa umożliwiła całkowite zagojenie się odleżyn IV stopnia, podczas gdy w grupie kontrolnej doszło do zwiększenia powierzchni tych odleżyn.

Jednym z potencjalnych sposobów zwiększenia skuteczności terapii, jest jej indywidualizacja, czyli dostosowanie formy terapii do charakterystyki procesu chorobowego i jej skuteczności u konkretnego badanego. Jaka jest opinia Autorki na temat możliwości sterowania procesem gojenia się odleżyny przy pomocy tych dwóch form elektrostymulacji wysokonapięciowej, na przykład dobierając elektrostymulację anodową lub katodową w zależności od stanu

odleżyny i etapu jej gojenia się? W tym kontekście chciałbym zwrócić się z pytaniem do Pani Doktorantki, czy w trakcie gojenia się odleżyn obserwuje się przeciwny kierunek jaki obserwuje się w czasie powstawania odleżyny, np. od stopnia IV do stopnia I i czy stan odleżyny miał wpływ na skuteczność elektrostymulacji wysokonapięciowej oraz w przypadku, gdyby tak było, czy wpływ ten był podobny czy różny w zależności od tego czy była to elektrostymulacja katodowa czy anodowa?

Innym czynnikiem, który może mieć wpływ na skuteczność elektrostymulacji jest długość czasu jej aplikowania, wspomniane 50 minut dziennie. Czy istnieją przesłanki, że zwiększenie czasu aplikacji byłoby korzystne?

Drugim celem Pani Doktorantki jest zbadanie, czy zastosowanie elektrostymulacji wysokonapięciowej wpływa na ekspresję genów kodujących trzy metaloproteinazy MMP -1,2 i 9 oraz trzy izoformy transformującego czynnika wzrost β TGF- β 1,2 i 3 i czy poziom ich ekspresji koreluje z tempem zmniejszania się powierzchni odleżyn. Wybór tych białek Pani Doktorantka uzasadniła tym, że badane przez Nią metaloproteinazy są zaangażowane w proces gojenia się rany, stężenie MMP-2 i MMP-9 wiąże się z nasileniem owrzodzeń żylnych, wzrost stężenia tych metaloproteinaz może utrudniać leczenie owrzodzeń cukrzycowych, zaburzać angiogenezę i migrację keratynocytów. Wpływ elektrostymulacji wysokonapięciowej na ekspresję genów tych metaloproteinaz w ranach nie był dotąd badany. Izoformy białka TGF- β pełnią ważną rolę w gojeniu się ran, ich niedobór i ich nadmiar spowalnia ten proces. W próbkach pobieranych z odleżyn Autorka nie znalazła dowodu na istotny wpływ elektrostymulacji wysokonapięciowej na ekspresję genów tych białek, nie stwierdziła też, aby poziom ekspresji korelował z prędkością malenia powierzchni odleżyn.

Przykrym obowiązkiem recenzenta jest zwrócenie uwagi na, jego zdaniem, pewne niedostatki rozprawy, co jednak, w przypadku takich jak ta -dobrych rozpraw, uwiarygadnia dobrą oceną tejże rozprawy.

Pierwsza uwaga dotyczy konstrukcji tekstu rozprawy. Wstęp jest bardzo obszerny i co ważne, ukazuje złożoność wieloetapowego procesu gojenia się ran, dzięki czemu czytelnik uzyskuje

kontekst dla zaproponowanych celów badawczych. Wstęp kończy się omówieniem bardzo skromnego ilościowo, bo składającej się z dwóch pozycji, piśmiennictwa tyżącego zmian poziomu czynników wzrostowych i cytokin we krwi u ludzi pod wpływem elektrostymulacji. Na końcu Wstępu, na stronie 24, znajdujemy jedno tylko zdanie uzasadniające drugą grupę celów badawczych, czyli zbadanie wpływu elektrostymulacji wysokonapięciowej na ekspresję genów kodujących wybrane przez Panią Doktorantkę białka. Początek obszernej informacji wyjaśniających rolę tych substancji w gojeniu się ran znajdujemy dopiero od strony 65 rozprawy do strony 69 w rozdziale Dyskusja, przy czym informacja ta jest połączona z omówieniem uzyskanych przez Panią Doktorantkę wyników dotyczących ekspresji genów kodujących wybrane białka. Sądę, że korzystne byłoby umieszczenie informacji wprowadzających i uzasadniających drugi cel pracy we Wstępie.

Druga uwaga dotyczy potrójnie pechowego efektu randomizacji badanych polegającego na tym, że po pierwsze w grupie kontrolnej średnia powierzchnia odleżyny jest wyraźnie większa, aniżeli średnia powierzchnia odleżyn w grupach, w których zastosowano elektrostymulację wysokonapięciową: 25 cm² vs. 18 i 17 cm². Po drugie, po 4 tygodniach terapii średnia powierzchnia odleżyn w grupie kontrolnej wynosi 20 cm² i jest większa od początkowej powierzchni odleżyn w grupach, w których stosowano elektrostymulację. Po trzecie, to właśnie w grupie kontrolnej tempo zmniejszania się powierzchni odleżyn jest najmniejsze, co zmusza do postawienia pytania o wpływ powierzchni odleżyny na tempo jej zmniejszania się. Opisany w rozprawie proces randomizacji jest poprawny i pozwolił on osiągnąć podobne charakterystyki trzech grup badanych. Ważnym wyjątkiem była średnia powierzchnia odleżyn. Warto w tym miejscu powiedzieć, że w procesie randomizacji może się zawsze zdarzyć, że dystrybucja jakiegoś parametru nie będzie podobna we wszystkich grupach. Całkowicie prawomocnym ruchem jest powtarzanie randomizacji tak długo, aż zostanie osiągnięta podobna charakterystyka wszystkich badanych grup. Jeśli jednak doszło do sytuacji takiej, jaka została opisana w rozprawie, dobrze by było zbadać, czy nierównowaga mogła mieć wpływ na uzyskane wyniki. W tym szczególnym wypadku być może należałoby zbadać korelację pomiędzy początkową powierzchnią odleżyny a tempem jej zmniejszania się. Myślę, że takie obliczenia warto by było zrobić, brak korelacji byłby argumentem przemawiającym za tym, że większa początkowa powierzchnia odleżyn w

grupie kontrolnej w porównaniu z grupami, w których zastosowano elektrostymulację nie jest przyczyną różnic w tempie zmniejszania się odleżyn.

I jeszcze jedna uwaga dotycząca bardzo częstego błędu w opisie wykresów. Polega on na niewłaściwym opisie osi rzędnych. Na rycinie 6 oś rzędnych opisana jest jako „Zmiana pola powierzchni”, ale na wykresie pokazane są pola powierzchni. Intencją Autorki było pokazanie zmian powierzchni odleżyn w czasie, ale czyni Ona to pokazując powierzchnie odleżyn. Chwili namysłu wymagało też ode mnie prawidłowe zrozumienie terminu „procentowa zmiana pola powierzchni odleżyn”. Jeśli pole maleje o 10% to czy zmiana pola powierzchni to 90% czy 10%, czy może -10%. A gdyby pole zwiększyło się o 10% to jaka byłaby jego procentowa zmiana? Wydaje mi się, że bardziej jednoznaczna byłby termin „procentowy ubytek powierzchni”. I jeszcze jedna uwaga, w tabeli 10 współczynnik korelacji ma taką samą wartość jak poziom istotności w pierwszych dziewięciu wierszach.

Kończąc tę recenzję, chciałbym zasugerować rozważenie dalszej analizy cennych, trudnych do uzyskania, wyników badań Pani Doktorantki. Myślę tu o potencjalnym bogactwie informacji ukrytym w wynikach niniejszych badań, na przykład zawartym w charakterystyce rozrzutu wyników wokół wartości średniej. Dobrą miarą wielkości tego rozrzutu jest współczynnik zmienności, oznaczany jako CV, czyli *coefficient of variation*, który jest stosunkiem odchylenia standardowego do średniej. Z danych podanych w tabeli 6 obliczyłem wartość tego współczynnika dla procentowego ubytku powierzchni odleżyny po 4 tygodniach leczenia; wynosiła ona dla elektrostymulacji katodowej 40,0%, anodowej 62,7%, w grupie kontrolnej 89,9%. Co ciekawe, współczynnik zmienności był tym mniejszy im lepsza była skuteczność terapii.

Wielkość współczynnika zmienności jest tym większa, im większy był odsetek osób, u których leczenie było wysoce skuteczne i takich, gdzie leczenie było mało skuteczne. Istnienie osób, u których terapia daje wyniki znakomite i odwrotnie, takich, u których ta terapia daje wyniki mierne, oznaczać może, że skuteczność terapii może być znacznie większa od jej uśrednionej skuteczności. Byłoby wielkim osiągnięciem znalezienie predyktorów stopnia skuteczności elektrostymulacji. Czy takim predykatorem może być charakterystyka odleżyny lub charakterystyka reakcji na rodzaj zastosowanej terapii? Studiując tabelę 3, widzimy jak wiele

parametrów opisuje badanego; bardzo trudno objąć je umysłem, żeby odkryć czy któryś z nich, lub jakaś ich szczególna kombinacja mogłaby służyć jako taki predyktor. I choć nie jestem entuzjastą sztucznej inteligencji, tu właśnie mogłaby ona mieć zastosowanie. W każdym razie warto by zachować jak najpełniejszą dokumentację opisanych w Rozprawie badań i zwiększać w miarę dalszych badań bazę danych, z myślą o jej wszechstronnej analizie, w celu zwiększenia skuteczności elektrostymulacji wysokonapięciowej w leczeniu odleżyn. I chcę tu jeszcze raz podkreślić, że wspomniane przeze mnie różne kierunki dociekań mają za podstawę medycznie wiarygodne wyniki uzyskane przez Panią Doktorantkę.

Podsumowując, Rozprawa przedstawia cenne wyniki z racji ich przydatności klinicznej i z racji potencjału rozwojowego elektrostymulacji wysokonapięciowej. Rozprawa wskazuje na kompetencję i rozległą wiedzę teoretyczną Autorki w dziedzinie objętej tematem badań. Pani Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i rozwiązywania problemów badawczych oraz przygotowania obszernej dysertacji. Uwagi krytyczne zamieszczone w recenzji, w żadnej mierze nie dyskredytują wartości ocenianej pracy.

W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska całkowicie odpowiada wymogom określonym w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 poz. 742 z późn. zm.) i w związku z tym pragnę przedstawić Radzie Naukowej Akademii Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach formalny wniosek o dopuszczenie Pani mgr Bogny Szołtys-Brzezowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z całego serca życzę Pani Doktorantce możliwości kontynuowania badań nad tą metodą i wnoszę o wyróżnienie tej Rozprawy.

Z poważaniem

Wiktor Niewiarski