Uniwersytet
Jana Kochanowskiego w Kielcach

Prof. zw. dr hab. n. med. Stanisław Głuszek
Kierownik Kliniki Chirurgii Ogólnej,
Onkologicznej i Endokrynologicznej

Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
UJK Kielce

Kielce, dn. 19.05.2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Tomasza Matyjasa**

„Obecność bakterii w żółci i złogach żółciowych z pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych"

Rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych **„Obecność bakterii w żółci i złogach żółciowych z pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych"** zajmuje 95 numerowanych stron maszynopisu, który obejmuje spis treści, spis skrótów, właściwy tekst rozprawy (64 strony), streszczenie w języku polskim i angielskim, spis piśmiennictwa (99 pozycji), spis rycin i tabel oraz aneks z załącznikami (Uchwałą Komisji Bioetyki UM w Łodzi nr RNN/339/KB z dnia 21.05.2013 r oraz oświadczenie Doktoranta.

**Wstęp** zajmuje 23 strony maszynopisu. Początek **Wstępu** traktuje krótko, ale wystarczająco, o rozwoju chirurgii pęcherzyka, klasycznej i laparoskopowej, podkreślając korzyści chirurgii małoinwazyjnej dla chorego. W Polsce, pierwsza cholecystektomia laparoskopowa miała miejsce 15.05.1991 r. w Poznaniu z udziałem chirurgów francuskich (prof. Jacques Domerque wspólnie z dr hab. Przemysławem Pydą), a samodzielna - 20.06.1991 r. w Warszawie (prof. Marek Krawczyk). W podrozdziale 1.2. **Epidemiologia**, Doktorant podkreślił, że w Polsce problem kamicy dotyczy ponad 20% populacji, wymienił czynniki ryzyka: płeć żeńska, BMI> 30kg/m$^2$ oraz wiek >50 r.ż.. W wieku powyżej 60 r.ż. ponad 30% kobiet ma złogi w pęcherzyku żółciowym. Z danych epidemiologicznych wynika więc, że problem kamicy pęcherzyka i dróg żółciowych stanowi znaczący problem zdrowotny, stąd też jest uzasadnienie do podjęcia projektu badań dla potrzeb recenzowanej rozprawy doktorskiej. W dalszej części **Wstępu** Doktorant przedstawił podział kliniczny,

objawy i powikłania kamicy żółciowej, zgodnie ze współczesną wiedzą kliniczną. Przejrzyście opisał problem ostrego zapalenia dróg żółciowych, ukazując przyczyny pierwotne zastoju żółci oraz charakteryzując patogenną florę bakteryjną, która jest odpowiedzialna za obraz kliniczny (triada Charcota, pentada Reynoldsa). W podrozdziale 1.4. Doktorant scharakteryzował leczenie operacyjne kamicy pęcherzyka żółciowego metodą otwartą i laparoskopową, uwzględniając wskazania do cholangiografii śródoperacyjnej. Opisał także znaczenie endoskopowej wstecznej cholangiopankreatografii. **Należy jednak skomentować, że współcześnie rzadko istnieje potrzeba cholangiografii śródoperacyjnej, gdyż przedoperacyjne badania obrazowe (USG, MRCP, CT) określają stan dróg żółciowych, a w przypadku obecności kamicy - problem przedoperacyjnie rozwiązuje się przy pomocy diagnostyki i terapii endoskopowej – sfinkterotomia, ewakuacja i kruszenie złogów, protezowanie (EPCW).** W dalszej części pracy Doktorant, wykorzystując trafnie cytowane piśmiennictwo, przedstawił patogenezę kamicy żółciowej podkreślając znaczenie składu żółci i wpływu różnych czynników, również modyfikowalnych na jej skład, takich jak dieta bogatotłuszczowa i nadmierna masa ciała. Dotychczasowe badania nie dowiodły ostatecznego związku przyczynowego pomiędzy zakażeniem bakteryjnym a powstawaniem złogów żółciowych. Stąd też zasadny jest wywód Autora, że oprócz samego zakażenia, w powstawaniu złogów, biorą czynniki bakteryjne oraz inne, które ułatwiają kolonizację - zaburzenia motoryki dróg żółciowych, zmiany błony śluzowej i składu żółci. Żółć i złogi w pęcherzyku żółciowym mogą być jałowe w bezobjawowej kamicy pęcherzykowej, natomiast kamicy przewodowej prawie zawsze towarzyszy zakażenie. W końcowej części pierwszego rozdziału Doktorant omówił problematykę identyfikacji materiału genetycznego bakterii. **Szkoda, że nie powiązał tej części z przesłanką, czyli uzasadnieniem podjęcia badań, czytelnik byłby wówczas przekonany o celowości zaplanowanych i przeprowadzonych badań. Ta część rozprawy jest przygotowana starannie. Autor wykorzystał właściwie piśmiennictwo, ale w mojej ocenie jest zbyt wiele pozycji podręcznikowych w spisie piśmiennictwa i cytowanych we wstępie. Warto i należy oczekiwać, że Doktorant dotrze do materiałów źródłowych.**

**Celem pracy** była identyfikacja bakterii w złogach żółciowych oraz w żółci u pacjentów operowanych z powodu objawowej kamicy żółciowej.

Z danych epidemiologicznych wynika, że problem kamicy pęcherzyka i dróg żółciowych oraz powikłania w przebiegu tej choroby stanowią znaczący problem zdrowotny. Dlatego też podjęty projekt badań uważam za ważny i przydatny z punktu widzenia klinicysty.

W rozdziale 3. **Materiał i metody** Autor scharakteryzował następująco grupę badaną. Badaniem objęto 52 pacjentów, operowanych w trybie planowym i pilnym w Klinice Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej (Centralnego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi), w okresie od września 2014 do marca 2017 roku. W badanej grupie były 34 (65,4 %) kobiety oraz 18 (34,6 %) mężczyzn w wieku 20 – 87 lat, średnio 57,4 lata. Wśród badanej populacji 39 (75 %) pacjentów przyjęto w trybie planowym z powodu objawowej kamicy pęcherzyka żółciowego, a 13 (25 %) w trybie dyżurowym z objawami ostrego zapalenia pęcherzyka żółciowego na tle kamiczym. Chorzy poddani zostali operacjom: cholecystektomii metodą laparoskopową – 42 osoby (81 %) oraz metodą laparotomii – 9 osób (17 %). U jednego pacjenta (2 %) wykonano endoskopową cholangiopankreatografię wsteczną z ewakuacją złogu (ECPW). **Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UM w Łodzi (RNN/339/13/KB z dn. 21.05.2013r.).** W opisie metod: metoda badania morfologii krwi, analizowano stężenie leukocytów w próbce krwi, badanie histopatologiczne materiału pooperacyjnego, w badaniu bakteriologicznym identyfikowano florę bakteryjną i jej wrażliwość na antybiotyki zgodnie z zaleceniami EUCAST (Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości - ang. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Badania wykonywane były metodą automatyczną oraz manualną. W metodzie automatycznej identyfikacje oraz określenie lekowrażliwości drobnoustrojów wykonano za pomocą aparatu Vitek2 firmy Biomerieux. Kolejnym etapem było zastosowanie metod genetycznych, izolacji DNA z zachowaniem odpowiednich zasad, startery i amplifikacja fragmentów 16S rRNA. Wyizolowany DNA namnażany z wykorzystaniem pary starterów zdefiniowanych protokołem, firmy Illumina 16S (ok.550 pz). Badane w tym przypadku są dwa regiony zmienne genu 16sV3 oraz V4. W 2. metodzie wykorzystano procedurę sekwencjonowania poszczególnych fragmentów genomu bakterii V3, V5 oraz V6 uprzednio projektując specyficzne pary starterów których przygotowanie zlecono firmie Sigma Aldrich. Cel pracy i metodyka badań, w tym

genetycznych, przedstawione są w mojej ocenie właściwie. W końcowej fazie badań dokonano niezbędnej analizy bioinformatycznej.

**Wyniki badań**

W grupie badanej 52 chorych (wiek od 20-87 r.ż) wykonano pełną morfologię krwi. Parametrem, który analizowano było stężenie leukocytów w pierwszej dobie hospitalizacji. U 11 (21 %) chorych stwierdzono leukocytozę, definiowaną jako liczbę leukocytów powyżej 10x103/µl. Rozkład liczby leukocytów przedstawiono w tabeli 4. Wśród operowanych pacjentów postawiono rozpoznanie śródoperacyjne, które w odniesieniu do płci przedstawiono na rycinie 10. Na rycinie 11 umieszczono rozpoznanie śródoperacyjne w porównaniu do średniej liczby leukocytów. Na kolejnych rycinach przedstawiono rozpoznanie histopatologiczne w odniesieniu do płci i średniej liczby leukocytów. W obszernej tabeli 5. przedstawione zostały szczegółowe dane epidemiologiczne oraz kliniczne grupy badanej ( wiek, płeć, rozpoznanie kliniczne, tryb przyjęcia, leukocytoza, rozpoznanie histopatologiczne).

W podrozdziale 4.2. **Wyniki bakteriologiczne** Doktorant stwierdził, że z żółci pobranej śródoperacyjnie w 15 (29%) przypadkach wyhodowano bakterie. Wyhodowane z posiewu żółci drobnoustroje stanowiła mieszana flora bakteryjna: bakterie tlenowe i beztlenowe. W 10 przypadkach identyfikowano jeden gatunek bakterii, natomiast w 5 więcej niż 1 gatunek (tab. 6). Obecność **bakteryjnego materiału genetycznego** zidentyfikowano w 7 złogach żółciowych z grupy 52 (13,5 %) stosując metodę 1. oraz w 20 z grupy 20 (100%) stosując metodę 2. **Dla czytelnika nie jest jasne dlaczego 2. metodą badano złogi tylko 20 chorych, w grupie badanej o liczebności 52. Zatem metoda 1. w tym badaniu byłaby w znacząco mniej wydolna ? Czy tak należy to interpretować?**

Metodą 2. biologii molekularnej zidentyfikowano bakterie do rodzaju i gatunku we wszystkich złogach żółciowych izolowanych od 20 pacjentów, u których łącznie zidentyfikowano 28 szczepów bakterii. **W tym miejscu Doktorant przedstawił następujące zestawienie szczepów bakterii i odsetki ich występowania**. Dominowały szczepy bakterii Gram-dodatnich należące do rzędu *Lactobacillales,* rodziny *Streptococcaceae*, rodzaju: *Streptococcus* - 9 (32%) i *Lactococcus* - 4 (14%), dodatkowo - rodzaj *Staphylococcus* – 2 (7%) należący do rodziny *Staphylococcaceae*, rzędu *Bacillales* oraz rząd *Clostridiales*, rodzina *Clostridiaceae*, reprezentowana przez rodzaj *Clostridium* - 2 (7%). Przedstawicielami

pałeczek Gram-ujemnych występującymi najliczniej były bakterie z rodzaju *Acinetobacter* należącego do rodziny *Moraxellaceae*, rzędu *Pseudomonadales* – 7 (25%), również dwa rodzaje należące do rzędu *Enterobacterales*, rodziny *Enterobacteriaceae*: *Buchnera* – 2 (7%) i *Klebsiella* – 1 (4%) oraz Salmonella - 1 (4%). Z grupy bakterii Gram-dodatnich najczęściej izolowano gatunki: laseczka zgorzeli gazowej - *Clostridium perfringens* – 2 (7%), *Streptococcus salivarius* – 4 (14%), *Lactococcus garvieae* – 2 (7%) oraz *Lactococcus lactis* – 2 (7%), *Streptococcus anginosus* – 4 (14%), Streptococcus constellatus - 1 (4%) jak i dwa gatunki gronkowców - *Staphylococcus aureus* – 1 (4%) i *Staphylococcus epidermidis* – 1 (4%). Florę Gram – ujemną reprezentowały gatunki – Acinetobacter baumanii - 7 (25%), *Buchnera aphidicola* – 2 (7%), *Salmonella bongori* – 1 (4%) oraz Klebsiella pneumoniae - 1 (4%). Wyniki badań zostały też zilustrowane na rycinie 14. i 15. Posiew bakteriologiczny żółci u 20 chorych, u których zidentyfikowano w złogach żółciowych bakteryjny materiał genetyczny, był jałowy u 12 (60%) pacjentów i dodatni u 8 (40%) pacjentów, u których wyhodowano w sumie 15 szczepów bakterii: 8 (53,3%) izolatów bakterii Gram–ujemnych oraz 7 (46,7%) izolatów bakterii Gram-dodatnich. Szczegółowe dane tej podgrupy chorych zostały przedstawione w tabeli 7.

**Dyskusja**

W dyskusji Doktorant podsumowując wyniki własnych badań stwierdza, że w wykonanych u wszystkich chorych posiewach żółci wzrost hodowli bakteryjnych obserwowano w 29% przypadków. Należy podkreślić, że bakterie hodowano u chorych bez klinicznych, morfologicznych i histopatologicznych objawów zakażenia operowanych w trybie planowym. Pomimo stwierdzenia ropniaka pęcherzyka żółciowego, towarzyszącej leukocytozy oraz histopatologicznego rozpoznania ostrego zapalenia pęcherzyka żółciowego, w niektórych przypadkach posiewy były jałowe. **A zatem należy zgodzić się ze stwierdzeniem Autora** - trudno jednoznacznie z zebranego materiału wyłonić konstruktywne wnioski. Konieczna jest analiza na większej grupie badanej. Doktorant, analizując czynniki bakteryjne w żółci i złogach, próbuje wyjaśnić mechanizm wpływu na powstawanie złogów.

**Dla mnie jako Recenzenta brakuje w dyskusji krytycznego porównania wyników badań bakteriologicznych żółci i złogów, w konfrontacji z piśmiennictwem. Ponadto wartościowe byłoby bardziej wnikliwe naświetlenia tego zróżnicowania**

**oraz wyciagnięcia stąd wniosków do dalszych badań, ale też wyjaśnienia takiego stanu rzeczy. Autor napisał o skąpym piśmiennictwie dotyczącym tego tematu, gdyż nie było wykonywanych wiele takich badań !?. Wpisałem do wyszukiwarki Pubmed (18.05.2019 r) słowa *„bacteria in bile"*, wówczas ukazała się informacja o 9699 pozycjach piśmiennictwa. Zapewne duża część nie dotyczy tego projektu, ale można znaleźć szereg prac oceniających bakteriologię i genetykę bakteriologiczną żółci i złogów w kamicy żółciowej.**

**Niemniej za wartościowe osiągniecie Doktoranta należy uznać częściowe potwierdzenie, że** bakterie są obecne w procesie tworzenia złogów żółciowych. Zdobyta wiedza na temat etiologii i patogenezy kamicy żółciowej, wyjaśnienie roli bakterii w procesie tworzenia złogów mogłoby w przyszłości pozwolić na wdrożenie bardziej skutecznego postępowania terapeutycznego.

**W ocenie Doktoranta** – pozwoliłoby to również określić działania o charakterze prewencyjnym w zastosowaniu antybiotykoterapii jako środka profilaktycznego. Należy mieć nadzieje, że metody badawcze oparte o techniki biologii molekularnej posłużą do optymalizacji standardów postępowania terapeutycznego w kamicy żółciowej. Doktorant w końcowej części Dyskusji stwierdził, że przeprowadzona analiza własna dowiodła możliwości wykorzystania nowoczesnych metod biologii molekularnej (sekwencjonowania) do identyfikacji materiału genetycznego w złogach żółciowych. W świetle przeprowadzonych badań i konkluzji konieczne jest zweryfikowanie wyników i kontynuowanie analiz mających na celu wykazanie roli bakterii w tak powszechnym schorzeniu jakim jest kamica żółciowa.

**Wnioski**

1. We wszystkich złogach z grupy 20 chorych (badanych z użyciem metody 2) identyfikowano materiał genetyczny bakterii.
2. Najczęściej izolowane rodzaje bakterii to *Streptococcus, Acinetobacter* oraz *Lactococcus.*
3. Zarówno w przypadku dodatnich posiewów bakteriologicznych żółci, jak i złogów, w których stwierdzono materiał genetyczny bakterii w większości identyfikowano więcej niż jeden rodzaj/gatunek drobnoustroju.

4. Skład flory bakteryjnej wnętrza złogu oraz żółci był w wielu przypadkach różny, co sugeruje, że w samym procesie tworzenia się złogu mogły brać udział inne rodzaje drobnoustrojów niż obecne w żółci podczas operacji.

Na zakończenie rozprawy Doktorant sformułował 4 wnioski. Są one właściwie podsumowaniem wyników badań. a nie właściwymi wnioskami. W rozumieniu metodologicznym wnioski pracy sięgają dalej niż podsumowanie wyników badań, a od realizującego projekt badawczy należy oczekiwać określenia myśli, przesłanek, ustaleń, których podstawą i punktem wyjścia było podsumowanie badań. **Ostatnie 2 akapity mojej recenzji, które przytaczają osiągnięcie Doktoranta jako wynik przeprowadzonych badań, odpowiednio sformułowane, byłyby bardziej trafnymi wnioskami wynikającymi z podsumowania badań.**

**Spis piśmiennictwa** jest dość ograniczony, liczy tylko 99 pozycji, znaczącą część stanowią pozycje książkowe z zakresu historii medycyny, chirurgii i genetyki, biotechnologii, Istotna część pozycji piśmiennictwa jest z ostatnich lat, z prestiżowych czasopism mikrobiologicznych i chirurgicznych.

**Podsumowując** - stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarza Tomasza Matyjasa jest wartościowym, samodzielnym, oryginalnym opracowaniem. W mojej ocenie rozprawa spełnia dostatecznie kryteria ustawowe dla prac na stopień doktora nauk medycznych. Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lekarza Tomasza Matyjasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

PROREKTOR
ds. medycznych
prof. zw. dr hab. n. med. Stanisław Głuszek