



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Dr hab. Dorota Kamińska

Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Anny Surówki

pt. : „Wpływ przewlekłego leczenia immunosupresyjnego na morfologię warstwy środkowej ściany aorty oraz równowagę pomiędzy metaloproteinazami (MMP-2, MMP-9) i ich inhibitorami (TIMP-1, TIMP2) w obrębie aorty brzusznej szczurów”.

Promotor: dr hab. n. med. Karolina Kędzierska-Kapuza

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Kamilia Szumilas

Przeszczepianie narządów jest przyjętą metodą leczenia pacjentów w schyłkowym stadium chorób. Od pierwszych prób przeszczepienia nerki leczenie immunosupresyjne jest podstawą osiągnięcia długotrwałego przeszczepienia narządu. Niestety niesie ze sobą ono liczne powikłania infekcyjne i metaboliczne, wpływające na skrócenie okresu przeżycia tak przeszczepionego narządu, jak i biorcy.

Naczynia krwionośne, a szczególnie śródbłonek naczyń tętniczych podlega uszkodzeniu zarówno w trakcie procedury transplantacyjnej, jak i w późniejszym okresie w procesach odrzucania przeszczepu i z powodu toksycznego działania leków. Opisywane są w literaturze zmiany morfologiczne zachodzące w naczyniach biorcy, a będące skutkiem stosowanej immunosupresji. Prowadzą one do licznych powikłań sercowo-naczyniowych takich jak choroba niedokrwienna serca, udary mózgu czy rozwarstwienie aorty.



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Jednym z mechanizmów uszkodzających naczynia jest niekontrolowany wzrost ekspresji i aktywności metaloproteinaz (MMPs), czyli grupy endopeptydaz biorących udział w bezpośredniej przebudowie elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Zaburzenia aktywności metaloproteinaz mogą prowadzić do rozwoju patologicznych zmian naczyniowych takich, jak tętniaki, przewlekła niewydolność żylna, czy miażdżyca. Miejscowa stymulacja układu immunologicznego oraz napływ komórek zapalnych po transplantacji powoduje wzrost aktywności metaloproteinaz, co wiąże się z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej.

Zbadanie wpływu metaloproteinaz na zmiany morfologiczne w ścianie naczyń, w kontekście stosowanego leczenia immunosupresyjnego może przyczynić się do pogłębienia wiedzy dotyczącej niekorzystnych działań leków immunosupresyjnych, a tym samym do poprawy opieki nad biorcą przeszczepu.

Z powyższych powodów mogę stwierdzić, że podjęty przez lek. Annę Surówkę problem badawczy omawiający wpływ przewlekłego leczenia immunosupresyjnego na morfologię warstwy środkowej ściany aorty oraz równowagę pomiędzy metaloproteinazami i ich inhibitorami w obrębie aorty brzusznej szczurów jest trafny, zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i praktycznego. Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Tytuł pracy uważam za właściwy. Praca ma charakter eksperymentalny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter monografii i typowy układ. Układ pracy nie budzi moich zastrzeżeń. Praca obejmuje 67 stron wydruku zawierającego 7 tabel i 4 ryciny. Spis dobrze dobranej i właściwie przytoczonego piśmiennictwa (111 pozycji) jest zamieszczony przy końcu pracy. Streszczenia w języku polskim i angielskim są umieszczone na końcu pracy.



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

We *Wstępie* Autorka szczegółowo omawia budowę ściany aorty, choć przydałoby się zaznaczenie różnic pomiędzy budową aorty u ludzi i szczurów, co mogłyby podnieść wartość obserwacji. Następnie Doktorantka opisuje charakterystykę metaloproteinaz oraz pełnionych przez nie funkcji, ze szczególnym uwzględnieniem powstawania blaszki miażdżycowej. *Wstęp* kończy się charakterystyką poszczególnych grup leków immunosupresyjnych.

Niejasne jest dla mnie przytoczone przez doktorantkę w końcowej części wstępu ( str. 21) zdanie brzmiące: „Zatem spodziewać się można, że leki immunosupresyjne nie wywierają żadnego efektu wobec komórek śródbłonna naczyń, czy komórek mięśni gładkich naczyńia”. Przeczy ono dostępnym danych i idei rozprawy doktorskiej.

W oparciu o przesłanki przedstawione we wstępie został prawidłowo sformułowany jeden cel główny oraz 5 celów szczegółowych rozprawy.

Dla zrealizowania zaplanowanych celów rozprawy Autorka po uzyskaniu zgody odpowiedniej Komisji Bioetycznej przeprowadziła doświadczenia na 36 samcach szczurów rasy Wistar. Materiał badawczy pochodził z uprzednio realizowanego przez Panią Promotor projektu. Zwierzęta podzielono na 6 grup, po 6 osobników w każdej. Zwierzęta z grupy kontrolnej nie otrzymywały żadnych leków, podczas gdy szczurom z poszczególnych grup eksperymentalnych podawano różne trójlekowe schematy leczenia immunosupresyjnego z życiem inhibitorów mTOR, inhibitorów kalcyneuryny, mykofenolanu mofetilu i glikokortykosteroidów.

Warto podkreślić, że Doktorantka nie zastosowała żadnego schematu immunosupresji, który nie zawierałby glikokortykosteroidów, co uniemożliwiło zbadanie wpływu tej grupy leków na ścianę naczyniową i aktywację metaloproteinaz.



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Po 6 miesiącach obserwacji preparaty z aorty brzusznej poddano ocenie morfologicznej z barwieniem H+E oraz uwidoczniono włókna kolagenowe z użyciem barwienia metodą Mallory Trichrome oraz czerwienią Syriusza. Dobór metod uważam za właściwy.

Barwienia immunohistochemiczne Autorka zastosowała do wykazania lokalizacji oraz poziomu ekspresji metaloproteinaz -2 i 9 i ich inhibitorów tkankowych.

Autorka prawidłowo opisała grupę badaną. Liczebność grupy jest wystarczająca do realizacji postawionego celu rozprawy. Metody badawcze zarówno dotyczące stosowania leczenia immunosupresyjnego wraz z określeniem poziomów leków, a także analizy morfologicznej i immunohistochemicznej są przeprowadzone i opisane prawidłowo. Wybór MMP- 2 i 9 oraz TIMP-1 i - 2 uważam za adekwatny. Enzymy te są szeroko badane w literaturze naukowej dotyczącej również transplantologii.

Analiza statystyczna została prawidłowo przeprowadzona z użyciem testów nieparametrycznych z uwagi na małą liczebność badanych grup.

W rozdziale *Wyniki* Autorka opisała w sposób uporządkowany uzyskane wyniki dotyczące zmian w budowie ściany naczynia i odniosła je do stosowanego leczenia immunosupresyjnego. Najbardziej wyraźne zmiany w budowie ściany naczynia oraz w budowie włókien elastycznych odnotowała w grupach rapamycynę i glikokortykosteroidy z dodatkiem cyklosporyny lub mykofenolanu. Zastosowanie inhibitorów kalcyneuryny, a szczególnie takrolimusu znosiło antyproliferacyjne działanie mykofenolanu. W dalszej części w szczegółowej analizie morfometrycznej Doktorantka wykazała różnice odległościach pomiędzy blaszkami sprężystymi w zależności od zastosowanej immunosupresji wykazując, że schematy leczenia immunosupresyjnego opartymi na takrolimucie korelowały z największym obszarem zajmowanym przez włókna kolagenowe.



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

W następnej części rozdziału *Wyniki* Autorka poddała szczegółowej analizie wzory ekspresji metaloproteinaz i ich inhibitorów, zarówno z zakresie lokalizacji jak i ilościowej oceny nasilenia ekspresji w ścianie aorty. Wyniki są zaprezentowane w uporządkowanych i jasny sposób, a załączone tabele i ryciny trafnie odnoszą się do prezentowanych danych.

Rozdział *Dyskusja* zawiera rzeczową i samodzielną interpretację wyników, a Doktorantka skonfrontowała własne wyniki z rezultatami innych autorów analizujących wpływ leków immunosupresyjnych na wystąpienie patologii naczyniowych, zarówno w pracach doświadczanych jak i obserwacjach klinicznych. Autorka analizuje własne wyniki odnosząc je do prac innych autorów, ze szczegółową analizą nie tylko zastosowanych metod badawczych, ale również stosowanych dawek leków immunosupresyjnych, co uważam za bardzo istotne.

W końcowej części *Dyskusji* Autorka właściwie analizuje słabe strony pracy odnoszące się do liczebności badanej grupy oraz mocne strony, do których należy długi okres badania obejmujący 6 miesięcy stosowania leczenia immunosupresyjnego, co w odniesieniu do długości życia człowieka odpowiada średniemu okresowi przeżycia przeszczepu nerki czy serca.

W oparciu o przeprowadzone badania oraz dyskusję Autorka przedstawiła 5 wniosków, które w pełni odpowiadają celom postawionym na początku pracy i są zgodne z otrzymanymi wynikami.

Za najistotniejsze uważam obserwacje potwierdzające już opublikowane dane kliniczne, wskazujące na to, iż połączenie mykofenolanu mofetylu z rapamycyną nie powoduje wystąpienia istotnych zmian morfologicznych oraz morfometrycznych w ścianie aorty. Jest to szczególnie istotne w kontekście znacznej hiperlipidemii powodowanej przez stosowanie inhibitorów mTOR. Schematy lecznicze immunosupresyjnego zawierające w



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

swym składzie inhibitory kalcyneuryny wywierały najbardziej niekorzystny wpływ na budowę ściany naczynia, niestety w realiach klinicznych schematy bez inhibitorów kalcyneuryny nie pozwalają na odpowiednią siłę zahamowania reakcji odrzuceniowej.

Za jedyny istotny mankament pracy uważam brak schematu leczenia immunosupresyjnego niezawierającego glikokortykosteroidów, co uniemożliwiło wyizolowanie wpływu tej grupy leków na morfologię ściany naczyniowej i ekspresję metaloproteinaz wraz z ich inhibitorami tkankowymi. Wpływ glikokortykosteroidów na patologię naczyniową nie jest też omawiany w dyskusji.

Zastosowane piśmiennictwo jest aktualne i dobrze dobrane, Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę, iż niektóre z cytowanych prac ( np. pozycja 7, 69) nie zawierają nazwisk badaczy a jedynie inicjały.

Praca została starannie opracowana pod względem edytorskim. Nieliczne błędy edytorskie pod postacią literówek nie obniżają wartości pracy. Jest napisana zwięźle, zrozumiałym językiem.

Uwagi krytyczne nie mają wpływu na ogólną ocenę pracy. Uważam, że rozprawa doktorska lek. Anny Surówki jest udaną próbą włączenia się w nurt badań dotyczących problematyki patologii układu naczyniowego w transplantologii. Autorka wykazała się wymaganą umiejętnością samodzielnego formułowania i rozwiązywania problemów naukowych, samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz wykazała się dobrym przygotowaniem merytorycznym i szeroką wiedzą teoretyczną w prezentowanej dyscyplinie. Praca jest rzetelnym opracowaniem właściwie opracowanego materiału badawczego z zastosowaniem adekwatnych narzędzi badawczych.



# UNIwersYTET MEDYCZNY

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Podsumowując stwierdzam, że oceniane opracowanie spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Mam zaszczyt złożyć Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie wniosek o dopuszczenie lek. Anny Surówki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na nowatorski charakter pracy oraz opublikowanie części wyników w renomowanym czasopiśmie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Wrocław 23.04.2022

*Dorota Kamińska*