



**I Klinika Nefrologii i Transplantologii
z Ośrodkiem Dializ
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku**

Białystok 2023,05,27

Ocena rozprawy doktorskiej

Lekarza Piotra Wiśniewskiego

**„Wpływ długotrwałej terapii immunosupresyjnej na komórki
nabłonka jelita szczura”**

Leki immunosupresyjne są powszechnie stosowane od wielu lat w zapobieganiu odrzuceniu narządów przeszczepionych. Jednak wiele innych chorób ma podłoże immunologiczne i stosowanie leków immunosupresyjnych wpływających na ten układ powoduje, iż te leki są powszechnie stosowane między innymi w leczeniu chorób reumatologicznych, dermatologicznych i alergologicznych. Wprowadzenie leczenia immunosupresyjnego pozwoliło, iż wiele chorób nie tylko pacjenci po transplantacji skutecznie jest leczonych poprzez zastosowanie leków immunosupresyjnych.

W leczeniu immunosupresyjnym biorców narządów przyczepianych stosuje się terapię wielolekową, która, wykorzystując różne punkty uchwytu leków, zaburza cały szlak odporności przeciwko antygenom obcego narządu, w mniejszym stopniu blokując poszczególne tory tej reakcji, a jednocześnie rozprasza działania niepożądane każdego ze stosowanych w niewielkich dawkach leków immunosupresyjnych. Najpowszechniej są stosowane schematy z zastosowaniem trzech leków immunosupresyjnych. Obecnie oprócz inhibitora kalcyneuryny podstawowymi lekami stosowanym w immunosupresji są leki antyproliferacyjne (azatiopryna, mykofenolan mofetilu, mykofenolan sodu) oraz glikokortykosteroidy. Stosuje się również w tych schematach dość często inhibitory szlaku mTOR (rapamycyne lub everolimus).

Jednak należy pamiętać że wszystkie stosowane leki immunosupresyjne mają różną dość często występujące działania uboczne, szczególnie, iż te leki są stosowanego przewlekłe często przez kilkadziesiąt lat. Między innymi często powodują różne powikłania ze strony układu pokarmowego.

W piśmiennictwie jest mało badań oceniających wpływ przewlekłego stosowania najczęstszych trójlekowych schematów leczenia immunosupresyjnego na morfologię i funkcję błony śluzowej jelita cienkiego. Poznanie efektów leczenia leków immunosupresyjnych stosowanych w różnych trójlekowych schematach na ścianę jelita mogłoby zapewne pomóc w wyborze bardziej optymalnego schematu leczenia.

Doktorant w pracy którą została mi przedstawiona do recenzji za cel rozprawy postawił ocenę wpływu przewlekłego stosowania leków immunosupresyjnych podawanych w schemacie trójlekowym na morfologię i funkcję błony śluzowej jelita cienkiego szczurów. Jest to temat który wymaga dokładniejszego poznania. Nadal niewiele wiadomo o efekcie stosowania różnych schematów leczenia immunosupresyjnego na integralność bariery nabłonkowej jelita cienkiego odgrywającej ważną rolę w procesach trawienia i wchłaniania składników pokarmowych. Pamiętać należy o częstych powikłaniach ze strony układu pokarmowego u pacjentów po transplantacjach narządów. Badania doktoranta zostały wykonane na modelu zwierzęcym. Uważam, iż cele jakie postawił doktorant są jak najbardziej interesujące, o potencjalnym bardzo praktycznym znaczeniu, i na pewno wartym podjętych badań

Przedstawiona mi do oceny praca ma typowy układ dla tego typu rozprawy doktorskiej. Liczy 61 stron, 2 tabele, 11 rycin i 3 schematy. Praca cytuje 107 pozycji piśmiennictwa, głównie anglojęzycznego z ostatnich lat dotyczącego badanych zagadnień.

Praca jest zaplanowana i przeprowadzona prawidłowo. Wstęp uzasadnia celowość podjętych badań. Materiał i metody przedstawione zostały przejrzysto, bardzo dokładnie i pozwalają na powtórzenie badań. W sposób czytelny przedstawiono zasady podziału badanych grup zwierząt. Wyniki są logiczną konsekwencją uzyskanych rezultatów.

Badania przeprowadzone zostało na szczurach (wykorzystano materiały archiwalne przechowywane w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w postaci bloczków parafinowych z zatopionym fragmentem jelita cienkiego pobranym od 18 szczurów samców podczas doświadczenia przeprowadzonego wcześniej). Wszystkie badane szczury podzielono na 3 grupy - grupę kontrolną bez leków i 2 grupy otrzymujące leczenie immunosupresyjne w schemacie 3 lekowym (jedna grupa otrzymywała takrolimus rapamycnę i

glikokortysterody a druga cyklosporynę rapamycynę i glikokortykosteroidy). Zwierzęta otrzymywały leki immunosupresyjne przez 6 miesięcy. Stężenia leków we krwi pełnej szczurów oznaczano po 4 godzinach od podania leków dojelitowo. Po upływie 3 miesięcy szczury zostały zważone i dawki leków dostosowano do aktualnej wagi zwierząt. Grupy badane liczyły po 6 szczurów. W czasie badania 2 szczury z grupy leczonej cyklosporyną nie przeżyły. Po zakończeniu badania zwierzętom pobrano fragment jelita cienkiego który odpowiednio przygotowano do badań morfologicznych, które zostały dokładnie opisane w rozdziale materiał i metody w ocenianej pracy doktorskiej. W skrawkach badanych jelit wykonano badania histochemiczne takie jak wybarwienie hemtoksylina-eozyną (H-E), trójbarwaną metodę Mallorego, oraz impregnację srebrem. Wykonano również badania immunohistochemiczne (immunoekspresja aneksyny V i białek połączeń międzykomórkowych).

Doktorant w swojej pracy w barwieniu H-E nie odnotował uchwytanych zmian w ogólnej morfologii jelita pomiędzy grupą kontrolną a grupami doświadczalnymi. Badając zawartość włókien kolagenowych typu I i typu III w błonie śluzowej kosmków i blaszki właściwej jelita zwiększoną ich zawartość stwierdził szczególnie w grupie szczurów leczonych cyklosporyną, rapamycyną i glikokortykosteroidami. Ponadto wykazał, iż w obu grupach badanych w porównaniu z grupą kontrolną wysokość nabłonka uległa obniżeniu. Analiza immunoekspresji aneksyny V we wszystkich badanych parametrach różniła się w badanych grupach w porównaniu z grupą kontrolną, a najwyższe były w grupie leczonej schematem trójlekowym z takrolimusem. Analiza immunoekspresji białek uczestniczących w tworzeniu połączeń pomiędzy walcowatymi komórkami nabłonka jelitowego zarówno okludyny, E-kadheryny jak i winkuliny wykazywały różnice pomiędzy badanymi grupami a grupą kontrolną. Cyklosporyna w połączeniu z rapamycyną i glikokortykosteroidami powodowała największe zmiany zwłóknieniowe w obrębie błony śluzowej jelita grubego.

Uzyskane wyniki doktorant przedstawił w przejrzystych tabelach i rycinach (bardzo mi się podobało przedstawienie wyników w ładnych łączących obraz histopatologiczny z przedstawieniem graficznym wyniku). Na podstawie uzyskanych wyników doktorant wyciągnął 4 poprawne wnioski, odpowiadające celom pracy.

Wyniki uzyskane przez doktoranta są dość ciekawe, inspirują do dalszych badań.

Doktorant oceniła i porównała wyniki uzyskane przez siebie z wynikami i danymi literaturowymi. Opisała je w sposób rzetelny i odpowiednio krytycznie odnosząc się do własnych wyników. Świadczy to o umiejętności interpretacji uzyskanych wyników. Doktorant jest również świadomy ograniczeń pracy.

Uwagi recenzenta:

Ograniczeniem badania, utrudniającym wyciągnięcie wniosków bardziej praktycznych jest, iż brakowało grupy u której w schemacie immunosupresji był mykofenolan mofetilu który powoduje najwięcej działań niepożądanych ze strony przewodu pokarmowego u pacjentów po transplantacji nerki. Wydaje mi się że praca byłaby znacznie ciekawsza gdyby uwzględniono grupy z mykofenolanem mofetilu.

Oceniana rozprawa doktorska poza tym nie budzi żadnych zastrzeżeń merytorycznych. Doktorant prawidłowo zaplanował i przeprowadził badania. Na podstawie uzyskanych wyników badań poprawnie wyciągnął wnioski odpowiadające celom doktoratu, a wymienione poniżej uwagi mają przede wszystkim charakter korektorski lub redakcyjny.

Piśmiennictwo:

W piśmiennictwie należy ujednolicić sposób pisania piśmiennictwo

- Niektóre pozycje są inaczej zapisane niż inne, zwykle po nazwie czasopisma jest rok ale np. pozycja 96, 99,100, 101 i 105 – rok jest na końcu.

Podsumowanie recenzji

Pomimo tych kilku krytycznych uwag głównie edytorskich należy podkreślić, rzetelność wykonania pracy, umiejętność skonfrontowania własnych wyników z danymi literaturowymi oraz potencjalne aspekty praktyczne i kliniczne tej pracy (ale to wymaga poszerzenia badań na grupy bez mykofenolanu mofetilu) . Praca doktorska udowodniła dobrą znajomości przez doktoranta zagadnienia, które na pewno wymaga dalszych badań. Wydaje się, iż wyniki uzyskane przez doktoranta mogą mieć duże większe znaczenie praktyczne co wymaga jednak potwierdzenie w badaniach na ludziach.

Podsumowując doktorant w badaniach na modelu zwierzęcym badał zagrożenia stosowanych leków immunosupresyjnych na wybrane parametry błony śluzowej jelita cienkiego. W uzyskanych wynikach wykazał liczne zmiany w błonie śluzowej jelit u zwierząt przyjmujących leczenie immunosupresyjne. Wyniki różniły się w zależności od zastosowanego schematu leczenia. Zarówno schematy leczenia z takrolimusem jak i cyklosporyną powodowały liczne zmiany w nabłonku jelit badanych szczurów.

Z merytorycznego punkty widzenia wyrażam opinię, że oceniana rozprawa dodaje do wiedzy o działaniu leków immunosupresyjnych sporo istotnych danych .

Rozprawa doktorska lek. Piotra Wiśniewskiego spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.)”

Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie lek. Piotra Wiśniewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

7049604 Prof. dr hab. Jacek Małyszko
specjalista nefrolog, hipertensjolog,
transplantolog kliniczny,
choroby wewnętrzne