

Gdańsk, 31.03.2022

dr hab. n. med. Magdalena Jankowska  
Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii  
i Chorób Wewnętrznych  
Wydział Lekarski  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Smoluchowskiego 17, 80-214 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej

Lek. Anny Surówki pt.: „Wpływ przewlekłego leczenia immunosupresyjnego na rozwój miażdżycy w aorcie brzusznej szczurów”

Leczenie immunosupresyjne jest niezbędną formą terapii pozwalającą na długotrwałe utrzymanie funkcji przeszczepionego narządu unaczynionego, poprzez zahamowanie odpowiedzi immunologicznej oraz zmniejszenie nasilenia procesów ostrego i przewlekłego odrzucania. Leczenie takie podejmuje się od momentu przeszczepienia narządu, aż do czasu ustania jego funkcji, a więc z zasady ma ono charakter przewlekły. Protokoły leczenia immunosupresyjnego po przeszczepieniu narządów obejmują schematy skojarzonego zastosowania kilku leków, co pozwala na wykorzystanie ich odmiennych mechanizmów działania, a także na zminimalizowanie ich toksyczności. Toksyczność leczenia immunosupresyjnego jest zależna od dawki i bezpośrednio związana z jego skutecznością. Obserwowana jest także toksyczność wtórna, niezależna od celu terapeutycznego. Temu ostatniemu zagadnieniu poświęcona jest przedstawiona mi do recenzji rozprawa lek. Anny Surówki.

Doktorantka podjęła się badań na temat powikłań sercowo-naczyniowych jako konsekwencji przewlekłego leczenia immunosupresyjnego. Powikłania sercowo-naczyniowe są główną przyczyną

skrócenia długości życia biorców narządów, a miażdżycza stanowi poważne ograniczenie w uzyskiwaniu dobrych odległych wyników transplantacji. Wiele danych przemawia za istotną rolą odpowiedzi immunologicznej w powstawaniu miażdżycy potransplantacyjnej, jednak patogenezę tego procesu nadal nie jest w pełni wyjaśniona. Nie wiadomo również, czy to specyficzne powikłanie potransplantacyjne wymaga odmiennego postępowania klinicznego niż miażdżycza obserwowana w populacji osób nie leczonych immunosupresyjnie.

Podjęcie takiej tematyki badawczej jest ważne zarówno z punktu widzenia nauk podstawowych, jak i praktyki klinicznej. Na uwagę zasługuje dojrzałość naukowa doktorantki w podejściu do tego zagadnienia przejawiająca się w próbach rozwiązywania dylematów klinicznych poprzez zaproponowanie adekwatnego modelu eksperymentalnego.

Przedłożona do recenzji praca liczy 67 stron i składa się z typowych dla rozprawy doktorskiej rozdziałów: wstępu, celu pracy, materiału i metod, wyników, dyskusji, wniosków, oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca zawiera także 7 tabel, rysunek, 4 ryciny oraz 111 pozycji piśmiennictwa. Umieszczony na początku pracy wykaz skrótów jest znacznym ułatwieniem lektury tekstu.

We wstępie doktorantka nakreśliła problem powikłań leczenia immunosupresyjnego po przeszczepieniu narządów unaczynionych. Wśród działań niepożądanych leczenia szczególną uwagę poświęciła zmianom w układzie sercowo-naczyniowym. Za zasadne uważam umieszczenie we wstępie szczegółowego opisu budowy ściany aorty oraz jej prezentacji graficznej. Było to dobre wprowadzenie do analizy zmian morfologicznych tego naczynia przedstawionych w dalszej części pracy. Poza zmianami morfologicznymi i morfometrycznymi autorka analizowała także ekspresję metaloproteinaz (MMPs) oraz ich inhibitorów (TIMPs) w ścianie naczynia, stąd we wstępie osobny podrozdział poświęcony został przeglądowi wiedzy o aktywności peptydaz w wybranych powikłaniach sercowo-naczyniowych. Wiedza ta w bardzo przejrzysty i syntetyczny sposób została przedstawiona w tabeli. Ostatnia część wstępu poświęcona została lekom immunosupresyjnym i mechanizmom ich działania.

Doktorantka podjęła się zbadania wpływu przewlekłego stosowania trójlekowych schematów leczenia immunosupresyjnego na powstawanie zmian w aorcie brzusznej szczurów. W sformułowaniu celu głównego obecna jest drobna niezręczność językowa, którą interpretuję jako błąd edytorski.

Celem pracy było zbadanie, czy przewlekłe stosowanie trójlekowych schematów leczenia immunosupresyjnego (tutaj zabrakło słowa np. „aplikowanych”, czy „wykorzystywanych”) u biorców narządów miało wpływ na morfologię aorty brzusznej szczurów oraz ekspresję MMPs i ich inhibitorów. Zwracam na to uwagę z obowiązku recenzenta, gdyż dla czytelnika pracy oczywiste jest, że leczenie podawane było w eksperymencie szczurom, a nie biorcom.

Hipoteza badawcza doktorantki została oparta na założeniu, że wpływ leczenia immunosupresyjnego na naczynia będzie możliwy do zaobserwowania w modelu eksperymentalnym poprzez analizę szeregu zmiennych (morfologicznych, morfometrycznych, immunoekspresji i immunolokalizacji MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2) w ścianie aorty zwierząt doświadczalnych. Na tej podstawie sformułowanych zostało pięć celów szczegółowych pracy, które świadczą o imponującej docieklivości oraz warsztacie badawczym doktorantki.

Aby zrealizować cele badawcze, autorka wykorzystwała materiał pozyskany z aorty brzusznej 32 szczurów podzielonych na pięć grup eksperymentalnych i grupę kontrolną. Zwierzęta z grup eksperymentalnych otrzymywały przez okres 6 miesięcy leki immunosupresyjne odpowiadające trójlekowym protokołom leczenia immunosupresyjnego stosowanym u biorców narządów unaczynionych. Były to następujące zestawy leków: takrolimus, mykofenolan mofetilu i glikokortykosteroid (TMG); cyklosporyna, mykofenolan mofetilu i glikokortykosteroid (CMG); takrolimus, rapamycyna i glikokortykosteroid (TRG), cyklosporyna, rapamycyna i glikokortykosteroid (CRG) oraz protokół stosowany jedynie w wyjątkowych sytuacjach klinicznych mykofenolan mofetilu, rapamycyna i glikokortykosteroid (MRG). Zastosowane dawki leków umożliwiły osiągnięcie stężenia terapeutycznego podawanych substancji we krwi badanych zwierząt. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że doktorantka w swojej pracy wykorzystwała materiał dostępny dzięki innemu, wcześniej przeprowadzonemu doświadczeniu. Świadczy to o odpowiedzialnym zaplanowaniu badań pozostającym w zgodzie z obowiązującymi aktami prawnymi regulującymi kwestie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

Metody analizy morfologicznej, morfometrycznej oraz procedury wykonane w badaniu immunohistochemicznym zostały opisane w sposób szczegółowy i jasny. Nie mam też zastrzeżeń do wyboru metod analizy statystycznej.

Wyniki stanowią najobszerniejszą część rozprawy. Układ tego rozdziału odpowiada zaplanowanym celom szczegółowym pracy. Bardzo cenne jest, że poza opisem wyników doktorantka przedstawiła też bogatą dokumentację fotograficzną uzyskanych rezultatów. W sytuacji, gdy uzyskane dane miały charakter ilościowy, zostały one przedstawione w formie czytelnych tabeli. Najważniejsze poczynione przez autorkę obserwacje to:

- stwierdzenie niekorzystnych zmian morfologicznych w ścianie aorty szczurów z grup leczonych TRG, CRG oraz TMG;
- stwierdzenie największej grubości błony środkowej aorty, największych odległości pomiędzy jej blaszkami sprężystymi oraz największej liczby jąder miocytów gładkich w grupie szczurów leczonych TMG;
- stwierdzenie największego względnego obszaru zajmowanego przez włókna kolagenowe w aortach szczurów leczonych schematami lekowymi zawierającymi takrolimus (TMG i TRG);
- stwierdzenie wzrostu ekspresji tkankowego inhibitora metaloproteinaz macierzy-1 (TIMP-1) względem ekspresji metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej-9 (MMP-9) w aortach szczurów leczonych schematami lekowymi zawierającymi rapamycynę (TRG, CRG i MRG).

W dyskusji autorka dokonała krótkiej rekapitulacji obecnego stanu wiedzy na temat wpływu poszczególnych leków immunosupresyjnych na patologię naczyń krwionośnych, a następnie skonfrontowała uzyskane wyniki własne z dostępnymi nielicznymi danymi literaturowymi oraz zaproponowała wyjaśnienie poczynionych obserwacji. Za najbardziej cenne doktorantka uznała ustalenie zależności pomiędzy ekspresją MMP-2 i MMP-9 oraz TIMP-1 i TIMP-2 a zaburzeniami morfologicznymi w ścianie aorty szczurów w wyniku przewlekłego podawania leków immunosupresyjnych. Trudno nie zgodzić się z tą opinią, gdyż jest to także najbardziej nowatorski element badania, który niewątpliwie poszerzył dotychczasową wiedzę w omawianej dziedzinie. Z punktu widzenia klinicznego, ciekawą obserwacją jest brak zmian morfologicznych i morfometrycznych w ścianie aorty u zwierząt leczonych rapamycyną.

W podsumowaniu dyskusji podkreślone zostały mocne strony pracy, takie jak bardzo długi czas leczenia zwierząt laboratoryjnych lekami immunosupresyjnymi oraz zastosowanie pełnych schematów trójlekowych, typowo podawanych pacjentom po transplantacji nerki. Z mojego punktu widzenia należy dodać jeszcze jedną mocną stronę tego badania, którą jest zastosowanie leków u zwierząt nie poddanych allotransplantacji. Pomogło to wykluczyć potencjalny wpływ odpowiedzi immunologicznej na obserwowane zmiany w ścianie naczyń i uzyskane wyniki przypisać zastosowanym schematom leczenia.

Autorka ma krytyczne podejście do uzyskanych danych, co odzwierciedla spostrzeżenie w podsumowaniu dyskusji, że jej wyniki stanowią wstęp do dalszych analiz oraz badań nad optymalizacją leczenia immunosupresyjnego.

Na podstawie przeprowadzonych badań, doktorantka sformułowała 5 wniosków końcowych, podsumowujących uzyskane wyniki. Kolejność wniosków nie odpowiada kolejności postawionych celów szczegółowych, co wprowadza niepotrzebny nieporządek. Ponadto nie mogę zgodzić się z częścią pierwszego wniosku, że zmiany w ekspresji MMP/TIMP wpłynęły na funkcję naczyń, bo przedstawione wyniki nie oceniały funkcji.

Piśmiennictwo wymaga korekty. Doktorantka powołuje się na nieaktualną klasyfikację Banff (pozycja 10) oraz nieaktualne zalecenia dotyczące leczenia immunosupresyjnego (pozycja 63). Oba dokumenty zostały już kilkakrotnie zaktualizowane. Prace z pozycji 7 i 59 zostały nieprawidłowo zacytowane (brakuje nazwisk autorów). Pozycja 50 jest publikacją w języku chińskim, a nie zaznaczono, że cytowanie dotyczy abstraktu.

Na korzyść doktorantki przemawia uwzględnienie w literaturze wielu publikacji polskich badaczy. To piękny gest świadczący o szacunku autorki dla wkładu naszego środowiska naukowego w rozwój omawianej dziedziny wiedzy.

Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o kilku usterkach redakcyjnych, chociaż zdaję sobie sprawę, że są one niemożliwe do uniknięcia przy tak rozległym opracowaniu. Za niefortunne uważam wymienne stosowanie terminów: leki immunomodulujące, czy chemioterapeutyki, na określenie leków immunosupresyjnych, gdyż nie są to pojęcia tożsame.

Powyższe sugestie i uwagi krytyczne nie zmieniają mojej pozytywnej opinii o pracy. Doktorantka wykazała się umiejętnością postawienia ciekawej hipotezy badawczej i kompetencjami w zakresie konsekwentnego dokumentowania dowodów naukowych pozwalających na uzasadnienie uzyskanych wniosków.

Podsumowując stwierdzam, że praca lek. Anny Surówki pt.: „Wpływ przewlekłego leczenia immunosupresyjnego na rozwój miażdżycy w aorcie brzusznej szczurów” jest opracowaniem samodzielnym, oryginalnym i wartościowym oraz odpowiada wymogom stawianym rozprawie doktorskiej. Wobec powyższego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Anny Surówki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
31.03.2022