

Dr hab. Albert Czerski  
Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt  
Zakład Fizjologii Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 21 czerwca 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani lekarz Diany Kupczyńskiej  
**pt. „Ocena miejscowej stymulacji neoangiogenezy po domięśniowym podaniu  
wybranych czynników proangiogennych u szczurów.”**

Wykonanej na Wydziale Lekarskim Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem promotora Pana prof. dra hab. Jana Skóry.

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego z dnia 13 czerwca 2018 roku (nr uchwały 529/VI/2018).

Temat podjęty przez doktorantkę jest aktualny i bardzo istotny z punktu widzenia chorego u którego wszelkie wcześniejsze próby ratowania niedokrwionych tkanek zawiodły. W warunkach chirurgii naczyniowej najczęściej jest to krytycznie niedokrwiona kończyna. Z przeglądu aktualnego piśmiennictwa wynika że zastosowanie terapii stymulującej neowaskulogenezę kończy się w około 50% sukcesem terapeutycznym (częściowo lub całkowicie uratowana kończyna). Zatem podejmowanie prób zwiększenia odsetka pozytywnych efektów leczniczych poprzez modyfikację dotychczasowego leczenia jest jak najbardziej uzasadnione.

Rozprawa doktorska ma typowy układ i składa się ze : spisu treści, wstępu, założeń i celu pracy, materiału i metod, wyników, dyskusji, wniosków, bibliografii, spisu rycin, streszczeń w języku polskim i angielskim. Całość zawarta jest na 89 stronach druku.

We wstępie doktorantka sporo miejsca poświęca rozwojowi chirurgii, w tym również chirurgii naczyniowej gdzie odbywa staż. Zauważa, że chirurgia naczyniowa wyodrębniona została z chirurgii ogólnej stosunkowo późno bo w latach 30-tych XX wieku. W Polsce po raz pierwszy o chorobach naczyń pisał prof. Stanisław Nowicki a w 2004 roku uznano chirurgię naczyniową jako odrębną specjalizację w krajach Unii Europejskiej. Następnie pisze o epidemiologii przewlekłego niedokrwienia kończyn i zauważa że istnieje konieczność prowadzenia licznych badań eksperymentalnych nad nowymi metodami leczenia. Środowisko medyczne oczekuje wsparcia w uproszczeniu procedur badawczych, możliwości wymiany doświadczeń z kolegami z innych krajów, zwiększenia nakładów finansowych na projekty badawcze i systemowych rozwiązań skierowanych zarówno do lekarzy i całego personelu medycznego, jak też do chorych i ich rodzin. Następnym punktem wstępu jest opis anatomii i histologii tętnicy zdrowej i chorej. W tym też miejscu opisuje proces angiogenezy. Doktorantka pisze o pięciu etapach angiogenezy : zwiotczenie ściany naczynia i pobudzenie komórek śródbłonna, degradacja błony podstawowej i macierzy pozakomórkowej, migracja i proliferacja komórek śródbłonna, wytworzenie struktur nowego naczynia, otoczenie nowopowstałych naczyń przez komórki mezenchymalne. Aby powstało nowe łożysko naczyniowe konieczne jest oddziaływanie czynnika wzrostu naczyń i angiopoetyny. Następnie doktorantka przechodzi do opisu patofizjologii i patomorfologii w zakresie angiogenezy oraz dojrzałych naczyń tętniczych, charakteryzuje czynniki odpowiedzialne za zaburzenie homeostazy co prowadzi do rozwoju patologii w ścianie naczynia. W kolejnym podrozdziale opisuje objawy, przebieg kliniczny oraz dostępne aktualnie metody lecznicze w miażdżycy zarostowej tętnic. Kolejnym podrozdziałem jest angiogeneza, w którym doktorantka już bardzo szczegółowo omawia to zagadnienie. Kończy wstęp stwierdzeniem . Podstawowym celem aktualnych badań jest stymulacja angiogenezy w odpowiednim miejscu,

tj. w obszarze niedokrwionym, bez jednoczesnego efektu ogólnoustrojowego bądź jednoczesnej stymulacji rozwoju nowotworu w miejscu podania lub w innych narządach. Co więcej, sukces procesu remodelingu naczyń po zakończeniu wzrostu osobniczego, zależy od: istnienia sieci arterioli łączących mikrokrążenie przed i za przeszkodą, aktywacji endothelium tętnic, spowodowanej stresem (niedokrwieniem); migracji macierzystych komórek szpiku kostnego, proliferacji komórek endothelium i komórek mięśni gładkich, tworzących nowe naczynia.

Wstęp jest wprawdzie dość rozległy ale czyta się go z zainteresowaniem i co ważne doktorantka wykazała w tym miejscu, że jest bardzo dobrze zaznajomiona z zagadnieniami, które bezpośrednio dotyczą jej rozprawy doktorskiej.

Drugi rozdział to założenia i cel pracy.

Lek. med. Diana Kupczyńska postanawia zbadać procesy molekularne związane z indukcją neowaskulogenezy stawiając następujące cele :

1. Ocena rekrutacji komórek progenitorowych CD 34 (+) śródbłonna naczyń krwionośnych po podaniu domięśniowym plazmidu ANG-1 i plazmidu bicystronowego ANG-1/VEGF-165.
2. Analiza różnicy w stopniu aktywacji komórek CD 34 (+) w zależności od podanych czynników angiogennych.
3. Porównanie miejscowej stymulacji angiogenezy w zależności od zastosowanych plazmidów angiogennych (podanie plazmidu zawierającego ANG-1 *versus* podanie plazmidu bicystronowego zawierającego ANG-1 i VEGF-165).
4. Ocena ryzyka występowania ogólnoustrojowych powikłań, w tym ewentualnej stymulacji rozwoju nowotworów, po zastosowanej terapii eksperymentalnej.

W rozdziale materiał i metody zaznacza że przeprowadzone przez nią badania uzyskały aprobatę Lokalnej Komisji do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Państwowej Akademii Nauk we Wrocławiu (nr zgody 49/2014) oraz zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego na przeprowadzanie doświadczeń na zwierzętach (nr zgody 10/2014/0027). W dalszej części opisuje proces przygotowania materiału do badań (plazmidów oraz czynników proangiogennych). Następnie charakteryzuje zwierzęta poddane badaniom, metody histochemiczne i immunochemiczne stosowane w ocenie wyników badań. Brakuje wyszczególnienia metod statystycznych zastosowanych w pracy.

W rozdziale wyniki doktorantka wykazała że dla zmiennej CD 34 występuje istotna statystycznie różnica pomiędzy grupą kontrolną a grupą VEGF-165/ANG-1 ( $p=0.000000$ ) oraz pomiędzy grupą kontrolną i ANG-1 ( $p=0.000582$ ) natomiast obydwie grupy badane nie różnią się od siebie w sposób istotny.

Dla zmiennej VEGF występuje istotna statystycznie różnica pomiędzy grupą kontrolną a grupą VEGF-165/ANG-1 ( $p=0.000000$ ) oraz pomiędzy grupą kontrolną i ANG-1 ( $p=0.000189$ ) natomiast obydwie grupy badane nie różnią się od siebie w sposób istotny.

W dyskusji doktorantka zauważa że terapia genowa i terapia komórkami macierzystymi znajdzie swoje miejsce w leczeniu chorych dotkniętych krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych, tym bardziej, że nie zamyka ani nie ogranicza ona stosowania innych metod leczenia.

U podstaw nadziei na opracowanie skutecznej metody leczenia niedokrwienia tkanek leży fakt, że jest to biologiczne rozwiązanie problemu. Tateishi i wsp. w 2002 roku w czasopiśmie *Lancet* przedstawili wyniki pilotażowego badania, polegającego na domięśniowym podaniu chorym z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych komórek uzyskanych z ich szpiku kostnego. W klinice w której pracuje doktorantka już wcześniej prowadzono podobne badania

podając w niedokrwione tkanki zarówno VEGF-165 z jednoczesnym podaniem komórek progenitorowych z własnego szpiku kostnego uzyskując lepsze wyniki niż przy podaniu tylko komórek szpiku. To zachęciło lek. med. Dianę Kupczyńską do prowadzenia dalszych badań na zwierzętach. Niniejsza praca udowadnia, że najbardziej optymalnym rozwiązaniem jest sekwencyjne podawanie pojedynczych czynników wzrostu. Ponadto wydaje się, że przyszłość medycyny regeneracyjnej leży w kombinowanej terapii, łączącej terapię genową z podawaniem komórek macierzystych. Doktorantka wykazała, że samo podanie plazmidu zawierającego gen kodujący ANG-1 indukuje neoangiogenezę u szczurów. Podanie ANG-1 chroni dojrzałe naczynia krwionośne przed nadmierną przepuszczalnością, chroni więc już powstałe naczynia przed negatywnymi skutkami czynników zapalnych. W kolejnym badaniu została wykazana skuteczność dwóch plazmidów bicistronowych – kombinacja VEGF-165/HGF jest bardziej skuteczna, niż ANG-1/VEGF-165. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że HGF stymuluje angiogenezę bez powstania stanu zapalnego, w przeciwieństwie do VEGF.

W podsumowaniu doktorantka stwierdza że biorąc pod uwagę stopień złożoności procesu angiogenezy i ludzkiego organizmu oraz liczne czynniki wpływające na niedokrwienie kończyn dolnych, naukowcy w XXI wieku stają przed wyzwaniem, jak skutecznie i bezpiecznie zmobilizować powstawanie krążenia obocznego w niedokrwionych organach.

Dyskusja została przeprowadzona z dużym znawstwem podobnych prac w piśmiennictwie światowym. Trzeba przyznać, że wyniki przedstawione w recenzowanej pracy są zachęcające do dalszych badań nad problemem neowaskulogenezy.

Pracę kończą wnioski które są odpowiedzią na postawione wcześniej cele pracy.

1. Zarówno podanie plazmidu bicistronowego ANG-1/VEGF-165, jak i konstruktów zawierającego tylko ANG-1, rekrutuje komórki CD 34 (+) śródbłonna naczyń

krwionośnych na modelu zwierzęcym, w porównaniu do grupy kontrolnej, która otrzymała pusty plazmid.

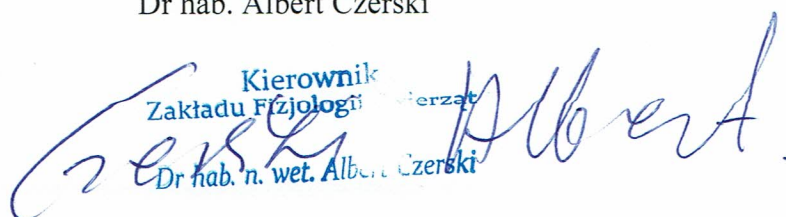
2. Nie ma istotnie statystycznej różnicy pomiędzy ilością rekrutowanych komórek CD 34 (+) pomiędzy ANG-1 a konstruktem ANG-1/VEGF-165.
3. Zarówno ANG-1, jak i ANG-1/VEGF-165, po podaniu domięśniowym, lokalnie stymulują angiogenezę w mięśniach kończyn dolnych szczura; nie wykazano natomiast istotnej różnicy pomiędzy badanymi grupami.
4. Zastosowana terapia jest bezpieczna, nie wywołuje skutków ubocznych w postaci obrzęków, zaburzeń rozwoju zwierząt, nie prowokuje także rozwoju nowotworów.

Podsumowując doktorantka w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej wykazała że potrafi samodzielnie zaplanować cel badawczy i skutecznie przeprowadzić badania, w tym przypadku na szczurach, wnosząc własny wkład w rozwiązywanie problemu nowo tworzenia naczyń w niedokrwionych tkankach.

**Rozprawa doktorska lek. med. Diany Kupczyńskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i § 6.3 Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora.**

**Stawiam zatem wniosek o dopuszczenie lek. med. Diany Kupczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Dr hab. Albert Czerski

  
Kierownik  
Zakładu Fizjologii i Patofizjologii  
Dr hab. n. wet. Albert Czerski