

Ocena pracy doktorskiej lek. med. Diany Kupczyńskiej pt.

**„Ocena miejscowej stymulacji neoangiogenezy po
domięśniowym podaniu wybranych czynników proangiogennych
u szczurów” napisanej pod kierunkiem Pana Prof. dr. hab. n.**

med. Jana Skóry

Praca doktorska Pani dr Diany Kupczyńskiej porusza niezmiernie ważny problem zdrowotny dotyczący przebiegu niedokrwienia kończyn dolnych, który ciągle jest jednym z najczęściej poruszanych w literaturze fachowej. Szeroko pojęte schorzenia sercowo-naczyniowe wraz z grupą chorób nowotworowych stanowią ciągle główne punkty rozwoju obecnej medycyny. Wraz z rozwojem nowoczesnych metod diagnostyki, sposobów leczenia chirurgicznego, coraz częściej sięgamy po przysłowiową „tabletkę”, która jest w stanie zaradzić temu, co kilka lat wcześniej jeszcze podlegało tylko leczeniu operacyjnemu.

Rozprawa napisana z typowym dla tego typu prac układem rozdziałów, obejmuje 90 stron maszynopisu. W rozprawie cytowanych jest 123 pozycji piśmiennictwa ukazujących się w tekście w kolejności poruszanych problemów.

Ponadto Autorka załączyła streszczenie w języku polskim i angielskim, spis tabel, rycin. Kolejność ukazujących się rozdziałów jest zgodna z zaleceniami Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Obszerny wstęp obejmujący liczne pozycje piśmiennictwa stanowi zwartą całość i może stanowić podstawę do artykułu popularno-naukowego, a uzupełniony o dane z pozostałych rozdziałów powinien zaistnieć jako pełnowartościowa pozycja w czasopiśmie fachowym. Autorka porusza w sposób bardzo dokładny, a zarazem praktyczny obraz powstawania niedokrwienia kończyn dolnych. Lek med. D. Kupczyńska analizuje przejrzyście przyczyny powstawania niedokrwienia kończyn dolnych, zwracając uwagę na powszechnie znane przyczyny predysponujące do rozwoju choroby. Cytując dane epidemiologiczne Autorka podkreśla wagę problemu jakim jest przewlekłe i krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych w starzejących się społeczeństwach Europy. Dokładnie opisuje historię rozwoju chirurgii naczyń obwodowych na przestrzeni lat analizując elementy ryzyka leczenia operacyjnego. Poruszony problem amputacji kończyny, konsekwencje oraz wydzźwięk społeczny stanowi ciągle jeden z najbardziej wrażliwych tematów wśród leczących (chirurgów

naczyniowych i angiologów), ale także i wśród osób dotkniętych miażdżycą tętnic kończyn dolnych. Autorka zwraca szczególną uwagę na cukrzycę, która jest jednym z najbardziej predysponujących do niedokrwienia kończyn czynnikiem. Szczegółowo opisuje charakter zmian naczyniowych obserwowanych w cukrzycy. Analizuje przebieg leczenia cukrzycy w kontekście protekcji zmian naczyniowych. Pozostałe czynniki jak palenie tytoniu, podniesiony poziom homocysteiny, czy zaburzenia lipidowe także zostały dokładnie opisane.

Aspekt chirurgiczny leczenia konsekwencji zmian miażdżycowych oraz następstw cukrzycy także został dokładnie opisany, włącznie z bardzo interesującym rysem historycznym. Obejmuje leczenie chirurgiczne i wewnątrznaczyniowe. Na samym końcu jednak, podsumowując obszerny wstęp całość sprowadza się do poziomu komórkowego, do którego chirurg nie ma lub ma tylko pośredni dostęp. Na tym poziomie może funkcjonować jedynie „lek/tabletka”. W tym wypadku to związki proangiogenne. To w nich upatruje się następnego kroku w leczeniu niedokrwienia kończyn dolnych. Proces neoangiogenezy w niedokrwionych kończynach dolnych jest tym, co może w znaczący sposób zabezpieczyć pacjenta przed amputacją. Dodatkowo w przypadkach, w których leczenie chirurgiczne jest niemożliwe pozostaje jedyną szansą na ocalenie kończyny. Prowadzone obecnie na świecie badania nad podawaniem czynników stymulujących powstawanie nowych naczyń w tym komórek macierzystych są ciągle mało popularne. Wynika to z wysokiej ceny odpowiednich odczynników i metod służących do wyizolowania poszczególnych związków pobudzających angiogenezę. Dodatkowym elementem utrudniającym wprowadzenie odpowiednich leków są badania już nie na „modelu” zwierzęcym, ale u pacjentów dotkniętych miażdżycą/cukrzycą kończyn dolnych – te wymagają licznych zgód.

Autorka postawiła 5 sprecyzowanych celów pracy:

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 stopnia transfekcji VEGF-165 w grupach.
5. Ocena ryzyka występowania ogólnoustrojowych powikłań, w tym ewentualnej stymulacji rozwoju nowotworów, po zastosowanej terapii eksperymentalnej.

Badania przeprowadzono w Katedrze Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Na przeprowadzenie badań Autorka uzyskała zgodę 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 przeprowadzania doświadczeń na zwierzętach (nr zgody 10/2014/0027). Do doświadczenia użyto 30 szczurów rasy Buffalo z wsobnego chowu, płci żeńskiej, o masie 190-220 g, z hodowli własnej Zwierzętarni Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Wszystkie zwierzęta podzielono na 3 grupy po 10 szczurów. Każdy szczur otrzymał 8-10 iniekcji domięśniowych w zakresie prawej

tylnej kończyny: 4 mg ANG-1 w grupie 1, 4 mg konstruktu bicistronowego VEGF-165/ANG-1 w grupie 2 oraz 4 mg nagiego plazmidu

w grupie 3 - Szczury przebywały w stałych warunkach z dostępem do wody i pożywienia, karmione były dietą standardową z domieszką witamin. Zwierzęta były obserwowane przez 3 miesiące - wszystkie przeżyły i nie wykazały żadnych oznak chorób. Następnie zwierzęta poddano eutanazji przy użyciu fenobarbitalu. Przeprowadzono sekcje, w trakcie których pobrano do badania histopatologicznego i immunohistochemicznego fragmenty zainfekowanych plazmidami ludzkimi (odpowiednio przygotowanymi wg procedury wskazanej przez producenta odpowiedniego zestawu) mięśni (z prawej kończyny tylnej), mięśni z lewej kończyny tylnej oraz płuc, śledziony, wątroby i nerek.

Pobrane preparaty po odpowiedniej obróbce oceniano pod kątem powstawania nowych naczyń, reakcji zapalnej, czy procesów karcinogenezy.

Uzyskane wyniki zostały opracowane przy pomocy odpowiednio dobranych testów statystycznych. Wyniki zostały przedstawione w czytelnie opracowanych tabelach zaopatrzonych w komentarz. Dołączone do tabel fotografie obrazów mikroskopowych dodatkowo urozmaicają pracę oraz pozwalają i pomagają ocenić, a także potwierdzić namacalnie uzyskane wyniki.

Po opracowaniu wyników w rozdziale „Wnioski” Autorka przedstawiła 5 wniosków, będących precyzyjną odpowiedzią na zadane cele:

1. Zarówno podanie plazmidu bicistronowego ANG1/VEGF-165, jak i konstrukt 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. Nie ma istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupami w kontekście transfekcji VEGF.
5. Zastosowana terapia jest bezpieczna, nie wywołuje skutków ubocznych w postaci obrzęków, zaburzeń rozwoju zwierząt, nie prowokuje także rozwoju nowotworów.

Reasumując powyższe rozważania niniejsza praca doktorska została napisana w sposób zgodny z ogólnie funkcjonującymi zasadami pisania prac badawczych. Pojedyncze błędy literowe, sylistyczne (proponuję zastąpić zwrot „stwierdzi się” na „zostanie potwierdzony” – str 14, pomiary glikemii a nie glukozy – str 13) lub brak indeksu skrótów, co nieco utrudnia czytanie nie umniejszają jej wartości. Praca ta, w opinii recenzenta, powinna jednak stanowić początek badań. Kolejnym etapem powinny być wyniki odległe i ostatecznie badania na modelu ludzkim. W wynikach przedstawionych na tym etapie nie ma potwierdzenia powstawania zmian nowotworowych, co może mieć miejsce w odległym czasie obserwacji. W tym miejscu nasuwa się także pytanie jaka jest przyszłość chirurgii naczyniowej związana z niedokrwieniem kończyn dolnych... Osobnym problemem jest zwrócenie uwagi na problemy toczące się obok postępującego niedokrwienia: dbanie o gospodarkę lipidową, kontrola glikemii, unikanie palenia tytoniu i wiele innych na które mamy określony wpływ.

Uważam, że podjęty temat i założenia pracy Pracy Doktorskiej Lekarza Diany Kupczyńskiej „Ocena miejscowej stymulacji neoangiogenezy po domięśniowym podaniu wybranych czynników proangiogennych u szczurów” zostały osiągnięte, a uzyskane wnioski wnoszą nowe informacje dla zespołu lekarzy, mających do czynienia z problemem przewlekłego niedokrwienia kończyn dolnych, dlatego też z tych względów zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lekarza Diany Kupczyńskiej do dalszych etapów procedowania rozprawy doktorskiej. Wnoszę także o przedłożenie do wyróżnienia niniejszej rozprawy doktorskiej.

Diana Lian