

Dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska, prof.nadzw.
Zakład Patologii i Neuropatologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
eczis@gumed.edu.pl

Gdańsk, 04.04.2016.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anety Wnęk pt. „Ocena wpływu propranololu na ekspresję białek regulujących proces apoptozy w naczyniakach wczesnodziecięcych”

Anomalie naczyniowe stanowią dość częstą i istotną grupę zmian guzowatych u dzieci. Część z tych zmian ma charakter wrodzony, inne pojawiają się i szybko rosną w okresie wczesno-niemowlęcym, jeszcze inne są wykrywane później w wieku rozwojowym. Klasyfikacje zmian naczyniowych na przestrzeni lat ulegały przekształceniom w związku z wzrastającą wiedzą dotyczącą szczegółowego obrazu klinicznego, charakterystyki w obrazowaniu radiologicznym zwłaszcza funkcjonalnym, efektywności leczenia oraz postępu w diagnostyce histopatologicznej i biologii molekularnej. Najczęstszymi dwoma typami zmian naczyniowych u dzieci, o odmiennym przebiegu i podejściu terapeutycznym, są malformacje naczyniowe i naczyniaki wczesnodziecięce. Szczególną cechą komórek śródbłonna w naczyniakach wczesnodziecięcych jest ekspresja GLUT1, która znalazła zastosowanie jako histopatologiczny marker diagnostyczny. Guzy te cechują się niezwykłą biologią, bowiem większość z nich po fazie intensywnego wzrostu ulega stabilizacji proliferacyjnej, a następnie inwolucji/ regresji. Większość z nich ma łagodny przebieg i charakter kliniczny. Guzy te mogą jednak prezentować indywidualny przebieg, a niektórzy autorzy wyróżniają nawet 6 faz ich ewolucji: wrodzoną/ wyjściową, wczesnej proliferacji, późnej proliferacji, plateau, inwolucji i fazę resztkową. Problem zdrowotny u części dzieci wynika z niekorzystnej lokalizacji i rozmiarów zmiany, a także niskiego potencjału regresji oraz pozostałości poinwolucyjnych. Pewien odsetek naczyniaków może powodować deformacje, istotne defekty kosmetyczne, ale również zaburzenia procesów fizjologicznych, wzrostu i funkcjonowania dziecka, jak i

wywoływać krwawienia i przewlekłe owrzodzenia. Na przestrzeni lat opracowano różne metody inwazyjnego i farmakologicznego leczenia naczynek wczesnodziecięcych. Krokiem milowym stało się odkrycie skuteczności propranololu i wprowadzenie go kilka lat temu do farmakoterapii tych guzów. Dotychczas jednakże nie jest znany szczegółowy mechanizm działania propranololu na proliferujące naczynia i procesy biologiczne zaangażowane w naczynekach wczesnodziecięcych. Poznanie tego mechanizmu jest istotne w kontekście optymalizacji efektywności terapii propranololem, jak i rozwój leczenia celowanego nowej generacji.

Badania przeprowadzone przez mgr inż. Anetę Wnęk dotyczą wybranych białek regulujących apoptozę w komórkach naczynek wczesnodziecięcych. Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu propranololu na ekspresję Bax, Bcl-2 oraz kaspazy 3 w naczynekach. Doktorantka przeprowadziła analizę tkankowej ekspresji powyższych białek w poszczególnych fazach ewolucji guzów nieleczonych i w przypadkach leczonych propranololem. Tematyka badań jest aktualna i zawiera określone wartości poznawcze o znaczeniu praktycznym.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Anety Wnęk obejmuje 84 strony tekstu, rycin i zdjęć, podzielonych w sposób typowy dla rozpraw na tytuł naukowy. Praca zawiera następujące rozdziały: wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, obszernie streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, piśmiennictwo, spis tabel, wykresów i rycin. Doktorantka zamieściła także przydatny wykaz skrótów i podsumowanie wyników.

Wstęp obejmujący 27 stron, podzielono na podrozdziały dotyczące charakterystyki klinicznej anomalii naczynek, etiopatogenezy naczynek wczesnodziecięcych, klasyfikacji anomalii naczynek, procesu angiogenezy, procesu apoptozy oraz leczenia naczynek ze szczególnym uwzględnieniem propranololu. We wstępie doktorantka prezentuje swoją wysoką wiedzę dotyczącą wielopłaszczyznowych aspektów zmian naczynek u dzieci. Autorka podkreśla istotną rolę właściwej diagnozy histopatologicznej w planowaniu leczenia u części pacjentów. Doktorantka analizuje zmiany w stosowanych klasyfikacjach klinicznych i histopatologicznych anomalii naczynek. Sygnalizuje też, że w badanych guzach proces apoptozy jest najprawdopodobniej aktywowany zarówno w fazie proliferacji i

regresji. Jednakże samą histologię naczynek wczesnodziecięcych omawia zbyt lakonicznie. Mechanizm angiogenezy, zaangażowany w biologię badanych guzów, również został we wstępie opisany skrótowo, a skomplikowany proces apoptozy zobrazowano bardzo uproszczonym schematem. Autorka zastosowała ponadto kilka niezręcznych skrótów myślowych, np. „angiogeneza komórek nowotworowych”(str. 19) oraz na str. 26 „w badaniu indeksu proliferacji antygenu naczyńniaka można badać ekspresję białek Bax i Bcl-2”. We wstępie znajdują się fotografie przedstawiające klasyczne obrazy kliniczne i histologiczne naczynek wczesnodziecięcych.

Cele rozprawy sformułowane zostały jasno i znajdują one odzwierciedlenie w korespondujących wnioskach.

W rozdziale materiał i metody doktorantka przedstawia szczegółową charakterystykę badanej grupy dzieci i analizowanych naczynek. Pracę wykonano na reprezentatywnym odpowiednio dobranym unikalnym materiale klinicznym i tkankowym. Materiał badawczy stanowiły wycinki z 71 przypadków naczynek wczesnodziecięcych usuniętych operacyjnie w dwóch polskich referencyjnych ośrodkach klinicznych chirurgii dziecięcej. Średni wiek dzieci wynosił 21,7 miesięcy. 27 przypadków stanowiły guzy leczone propranololem, a pozostałe 44 przypadki stanowiły naczyniaki w różnych fazach ewolucji, nieleczone propranololem. W rozdziale doktorantka opisuje następnie stosowane metody diagnostyki histopatologicznej, techniki immunohistochemiczne oraz metody analizy statystycznej. Szczegółowość metodyki procedur immunohistochemicznych świadczy o rzetelności autorki oraz umożliwia innym badaczom przeprowadzenie podobnych analiz. Nie znajdują jednakże informacji odnośnie zasad histologicznej kwalifikacji zmian do poszczególnych faz ewolucji naczynek, bowiem autorka wspomina o bliżej nieokreślonej metodzie immunohistochemicznej. Analiza statystyczna została przeprowadzona prawidłowo, w oparciu o właściwie dobrane testy statystyczne.

Wyniki pracy szczegółowo przedstawiono na 16 stronach, włączając tabele, wykresy i fotografie. Pierwsza część wyników zawiera kliniczne i pato- kliniczne aspekty badań. W drugiej części autorka przedstawia wyniki badań immunohistochemicznych ekspresji wybranych białek regulujących apoptozę w naczynekach leczonych i nieleczonych propranololem. Opisując te wyniki

doktorantka użyła miejscami nietypowych sformułowań: „średnia wartość dodatniej ekspresji”, „średnia wartość białka”, „stosunek i rozkład ekspresji”. W odniesieniu do zastosowanej metody oceny badanych białek w komórkach naczynek (procent komórek immunoreaktywnych na 1000 analizowanych komórek śródbłona), najlepszym określeniem byłby indeks komórek reaktywnych, współczynnik ekspresji, czy też odsetek dodatnich komórek. W swych badaniach doktorantka ujawniła znamienne niższy współczynnik ekspresji Bcl-2 i wyższy białka Bax w grupie leczonej, niż w przypadkach nieleczonych. Ponadto wykryła, że immunoreaktywność białka Bcl-2 była wyższa w naczyniach w fazie proliferacji, niezależnie od leczenia. Przeprowadzone badania ujawniły także związek pomiędzy zmniejszaniem się ekspresji Bcl-2 w guzach a wiekiem dzieci oraz długością terapii propranololem. Dołączona dokumentacja fotograficzna jest bardzo dobrej jakości.

W merytorycznej dyskusji obejmującej 12 stron, doktorantka przeprowadza analizę piśmiennictwa i odnosi się rzeczowo do swych wyników, jak i krytycznie rozważa ich przydatność. Omawia aktualne koncepcje odnoszące się do kliniki i biologii anomalii naczyniowych u dzieci, metod leczenia oraz działania propranololu na wzrost naczynek i proces angiogenezy. Jednym z proponowanych mechanizmów działania związanym z leczeniem naczynek jest zmniejszenie ekspresji VEGF i bFGF. Inni badacze dowodzą interakcji beta-blokera ze szlakami sygnałowymi kontrolującymi komórki progenitorowe naczynek. Poza tym istnieje hipoteza blokowania angiogenezy indukowanej katecholaminami, jak i przerwanie sygnału przeżycia komórek śródbłona podtrzymywanego hemodynamicznie, wreszcie inhibicji osi renina-angiotensyna. Kolejna teoria zakłada indukowanie przez propranolol apoptozy komórek śródbłona naczynek poprzez antagonizm wobec receptora dla GLUT1. Doktorantka analizuje także inne dane literaturowe na temat roli apoptozy w rozwoju i regresji naczynek wczesnodziecięcych. Należy podkreślić, że właśnie niedostatek badań nad działaniem propranololu na proces apoptozy skłonił autorkę do podjęcia pracy. W swoim materiale autorka ujawniła immunohistochemicznie ekspresję wszystkich trzech badanych białek regulujących apoptozę- Bcl-2, Bax i kaspazy 3 w komórkach naczynek wczesnodziecięcych. Stwierdziła związki pomiędzy stopniem ekspresji Bcl-2 a fazą wzrostu guzów oraz

Bax i Bcl-2 a leczeniem propranololem. Część wyników badań doktorantki znajduje potwierdzenie w dostępnym bardzo skąpym piśmiennictwie, inne mają charakter pionierski. Na końcu dyskusji doktorantka wskazała potencjalne kierunki dalszych pogłębionych badań.

W bibliografii liczącej 123 pozycje, doktorantka uwzględniła najważniejsze prace dotyczące tematyki dysertacji opublikowane w ostatnich latach w czasopismach zagranicznych i piśmiennictwie polskim. Piśmiennictwo jest dobrane właściwie i wymienione pozycje zostały wykorzystane w tekście pracy. Stwierdzam jedynie brak uwzględnienia w dysertacji jednej pozycji – artykułu pogładowego autorstwa doktorantki (A. Wnęk, i in. Kontrowersje na temat klasyfikacji histopatologicznej anomalii naczyniowych u dzieci. Nowotwory 2015), pominiętego przypuszczalnie celem uniknięcia autocytowania.

Badania mgr inż. Anety Wnęk są oparte o ujednoliczoną ocenę dużego liczebnie unikalnego materiału naczynek wczesnodziecięcych. Jasno sprecyzowane wnioski pracy doktorskiej wskazują na efekt proapoptotyczny jako jeden z mechanizmów działania propranololu na analizowane guzy.

Reasumując, pomimo wymienionych przeze mnie uwag, przedstawiona rozprawa doktorska mgr inż. Anety Wnęk spełnia aktualne wymogi ustawowe stawiane pracom na stopień doktora w zakresie biologii medycznej. Dysertacja stanowi oryginalne osiągnięcie badawcze samodzielnie rozwiązane przez autorkę i świadczy o Jej wiedzy merytorycznej oraz wysokim zaangażowaniu w opracowywane zagadnienie.

Zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Anety Wnęk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Patologii i Neuropatologii
dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska

Dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska, prof. nadzw.

Gdański Uniwersytet Medyczny

