



**WOJSKOWY INSTYTUT MEDYCZNY
CENTRALNY SZPITAL KLINICZNY MON**

ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa

Klinika Dermatologiczna

tel. +48 261 816 241; tel./fax: +48 261 817 187

Warszawa. 27.12.2019

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lekarza Pawła Kolano

W przedstawionej mi do recenzji rozprawie doktorskiej lek. Pawła Kolano pt.; „Udział zaburzeń angiogenezy i macierzy zewnątrzkomórkowej w rozwoju owrzodzeń podudzi” postawiono sobie za cel ocenę aktywności wybranych białek zawiadujących metabolizmem tkanki łącznej tj. metaloproteinaz MMP-1 i MMP-9, tkankowego inhibitora metaloproteinaz (TIMP-1), białek uczestniczących w procesie angiogenezy tzn: VEGF i angiogeniny oraz białka regulującego proces bliznowacenia jakim jest katepsyna K w patogenezie owrzodzeń żylnych. Owrzodzenia żylna stanowią zarówno istotny problem medyczny jak i społeczny ze względu na swój przewlekły, nawrotowy charakter oraz konieczność długotrwałego i kosztownego leczenia. Należy zaznaczyć, że ryzyko ich rozwoju znacząco wzrasta z wiekiem i choruje na nie ok. 3-5% populacji powyżej 65 roku życia. Na częstość występowania owrzodzeń wpływają także czynniki demograficzne i środowiskowe m.in. wiek, siedzący tryb życia, otyłość i palenie papierosów. Najczęstszą przyczyną powstawania owrzodzeń zlokalizowanych w obrębie goleni jest niewydolność naczyń żylnych. Wśród głównych czynników ryzyka ich rozwoju wymienia: się starszy wiek i płeć męską,

refluks żylny, zakrzepicę żył głębokich, przebyty zespół pozakrzepowy, wysoki wskaźnik masy ciała, niską aktywność fizyczną, pracę stojącą, nadciśnienie tętnicze oraz predyspozycje rodzinne. Leczenie owrzodzeń jest niezwykle trudne z uwagi na wzajemnie oddziaływanie nieprawidłowych procesów naczyniowo-zapalnych. Prawidłowe i skuteczne leczenie powinno obejmować wszystkie elementy patogenezы choroby. Rola poszczególnych czynników wpływających na rozwoju owrzodzeń, pomimo wielu lat badań wciąż nie jest w pełni poznana. Brakuje badań na temat określenia zależności ekspresji białek takich jak MMP-1, MMP-9, TIMP-1, VEGF, angiogeniny oraz katepsyny K, a rozwojem choroby u pacjentów z owrzodzeniami żylnymi. Choroba stanowi istotny interdyscyplinarny problem medyczny. Wybór przez Doktoranta tematu pracy uważam zatem za szczególnie trafny i zgodny z oczekiwaniami. Świadczy to w mojej ocenie o umiejętności Doktoranta planowania badań naukowych.

Rozprawa ma klasyczny podział na rozdziały – wstęp, założenie i cele pracy, materiały i metody, analizę statystyczną, wyniki, dyskusję, zakończenie oraz wnioski zgodnie z wymogami formalnymi zawartymi w Ustawie o Stopniach i Tytułach naukowych (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595). Zawiera łącznie 89 stron tekstu, 12 rycin i 12 tabel. W pracy znajdują się odniesienia do 146 pozycji piśmiennictwa.

Wstęp zawiera opis rysu historycznego choroby, jej epidemiologii, kosztów opieki, patofizjologii i przyczyn rozwoju owrzodzeń żylnych, jak również przedstawia informacje dotyczące owrzodzeń w przebiegu piodermii zgorzelinowej i chorób tkanki łącznej, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy i zespołu antyfosfolipidowego. Zawiera również szczegółowe informacje dotyczące obrazu klinicznego, oceny zaawansowania obejmującej m.in. klasyfikację CEAP oraz wykonywanych badań przepływu i wydolności układu żylnego tzn. testów fizykalnych i ultrasonografii dopplerowskiej. W rozdziale znajduje się także opis metod leczenia owrzodzeń i wpływu ich obecności na jakość życia chorych. Uzupełnienie rozdziału pierwszego stanowią informacje dotyczące roli wybranych białek w rozwoju owrzodzeń żylnych tzn. MMP-1, MMP-9 i TIMP-1, VEGF, angiogeniny oraz katepsyny K. Rozdział pierwszy zawiera zatem istotną wiedzę stanowiącą podstawę teoretyczną podjętych badań. W tym miejscu warto zaznaczyć, że zwraca się uwagę iż nazwa związana z anatomicznym umiejscowieniem owrzodzeń powinna brzmieć owrzodzenia żyłne goleni. Termin owrzodzenia żyłne podudzi natomiast od lat funkcjonuje w piśmiennictwie pomimo nieprawidłowej nazwy anatomicznej.

Rozdział drugi zawiera założenia i prawidłowo sformułowane oraz podane w czterech punktach szczegółowe cele badawcze tzn.:

- 1) Ocena stężenia MMP-1 i MMP-9 w surowicy krwi pacjentów zdrowych i chorujących na owrzodzenia żyłne podudzi;
- 2) Ocena stężenia TIMP-1 w surowicy krwi pacjentów zdrowych i chorujących na owrzodzenia żyłne podudzi;
- 3) Ocena stężenia VEGF i angiogeniny w surowicy krwi pacjentów zdrowych i chorujących na owrzodzenia żyłne podudzi;
- 4) Określenie potencjalnej roli katepsyny K i VEGF w rozwoju owrzodzeń podudzi poprzez immunohistochemiczną ocenę ich ekspresji w bioptatach skóry pochodzących z owrzodzeń żylnych podudzi.

W rozdziale trzecim i czwartym opisane zostały materiały i metody badań oraz analiza statystyczna. W badaniu uczestniczyło łącznie 71 osób rasy kaukaskiej (38 kobiety i 33 mężczyźni), spośród których 39 stanowili pacjenci z owrzodzeniami żylnymi. Grupę kontrolną stanowiło 32 zdrowych wolontariuszy. Średni wiek pacjentów (\pm odchylenie standardowe) w grupie badanej wynosił $72,12 \pm 5,37$, a w grupie kontrolnej $72,19 \pm 3,90$ lat. Średni czas trwania choroby wyniósł $4,47 \pm 3,18$ roku. U wszystkich osób z grupy kontrolnej i badanej oznaczono stężenia białek MMP-1, MMP-9, TIMP-1, VEGF i angiogeniny w surowicy wykorzystując odczynniki firmy R&D Systems Europe (Abingdon, UK). Spośród grupy badanej i kontrolnej wyodrębniono podgrupę ochotników, którzy oprócz oznaczenia podstawowych parametrów z surowicy krwi, wyrazili zgodę na pobranie biopsji ze skóry. Pobrane bioptaty skóry u osób z obu grup zostały wykorzystane do badań ekspresji katepsyny K i VEGF metodą immunohistochemiczną. U wszystkich pacjentów z grupy badanej owrzodzenie było zmianą pojedynczą i znajdowało się w okolicach kostki przyśrodkowej. Wszystkie zmiany skórne zostały sklasyfikowane z wykorzystaniem klasyfikacji CEAP jako C6 Ec As,D Pr,O (zmiany skórne z aktywnym owrzodzeniem, o znanej etiologii wtórnej, z zajęciem żył powierzchownych i głębokich z refluksem i zwężeniem światła naczyń). Opracowanie statystyczne wyników zostało wykonane z użyciem oprogramowania Statistica. Metodyka badań jest prawidłowo dobrana do postawionych celów pracy.

W rozdziale piątym przedstawiono wyniki otrzymane w trakcie przeprowadzonych badań. Podzielony jest na pięć podrozdziałów, w których przedstawiono wyniki oceny danych demograficznych, oceny stężeń MMP-1, MMP-9, TIMP-1 w grupie badanej i kontrolnej, stężeń VEGF i angiogeniny w grupie badanej i kontrolnej, ekspresji katepsyny K i VEGF w badaniu immunohistochemicznym oraz analizę korelacji pomiędzy poszczególnymi zmiennymi. W podrozdziałach znajduje się tabele i ryciny przedstawiające analizę statyczną z komentarzem w pełni umożliwiającym ich zrozumienie. Uzupełnieniem podrozdziału 5.4 są ryciny przedstawiające wyniki immunohistochemiczne. Rozdział szósty to dyskusja. W części tej w sposób rzetelny Doktorant porównał wyniki badań własnych z dostępnymi w piśmiennictwie wynikami badań innych autorów. Rozdział podzielony jest na trzy części dotyczące omówienia otrzymanych w trakcie badań własnych wyników stężeń MMP-1, MMP-9 i TIMP-1 w surowicy krwi pacjentów zdrowych i chorujących na owrzodzenia żyłne podudzi, stężeń VEGF i angiogeniny oraz ekspresji katepsyny K i VEGF w badaniu immunohistochemicznym. W trakcie badań własnych Doktorant wykazał, że stężenie białek MMP-1 i MMP-9 w surowicy krwi było istotnie statystycznie wyższe u pacjentów z owrzodzeniami żylnymi goleni w porównaniu do osób zdrowych. Stężenie TIMP-1 nie różniło się natomiast istotnie w badanych grupach. Wyniki te są zgodne z dostępnymi danymi piśmiennictwa i wskazują na rzetelne wykonanie badań. Doktorant trafnie wskazuje na możliwość wykorzystania wyjściowych wartości MMP-1, MMP-9 i TIMP-1 jako elementów rokowniczych gojenia się owrzodzenia. Przeprowadzone badania potwierdzają zatem rolę MMP-1, MMP-9 i TIMP-1 w patogenezie owrzodzeń żylnych. Doktorant wskazuje również na brak w dostępnej literaturze badań porównawczych oceniających stężenie metaloproteinaz i TIMP-1 w osoczu i płynie surowiczym pochodzącym z owrzodzenia. Może być to zatem elementem dalszych badań Doktoranta. W badaniu własnym Doktorant nie wykazał różnic istotnych statystycznie w ocenie średnich stężeń angiogeniny w grupie badanej i w grupie kontrolnej. W piśmiennictwie brak jest publikacji na temat oceny stężenia angiogeniny w osoczu pacjentów z owrzodzeniami żylnymi. Fragment ten stanowi zatem nowatorski aspekt pracy. Dane piśmiennictwa wskazują, że ekspresja VEGF koreluje dodatnio z zaawansowaniem choroby ocenionym wg klasyfikacji CEAP. Wyniki badań przeprowadzone przez Doktoranta potwierdzają tę tezę. W badaniach własnych lek. Pawła Kolano średnie stężenie VEGF było istotnie wyższe u pacjentów z owrzodzeniami, niż w grupie kontrolnej i wynosiło ($589,33 \pm 346,21$ pg/ml dla grupy badanej vs $220,28 \pm 110,36$ pg/ml dla grupy kontrolnej). Doktorant trafnie dokonuje analizy otrzymanego wyniku, przy braku bezpośrednich danych, tłumacząc iż przyczyną wzrostu VEGF w surowicy jest fakt, że w środowisku owrzodzenia żylnego dochodzi do aktywacji

platek krwi i makrofagów, które wydzielają VEGF, powodując jego uwolnienie do krwiobiegu. Dodatkowo w badaniu własnym lek. Paweł Kolano wykazał istnienie silnej, istotnej zależności pomiędzy gęstością mikronaczyń krwionośnych/mm² a ekspresją VEGF. Korelacja ta potwierdza dodatkowo otrzymane na wcześniejszych etapach badań wyniki. Dostępna jest niewielka liczba publikacji wyjaśniająca rolę katepsyny K w patogenezie owrzodzeń żylnych. W badaniu własnym Doktorant wykazał, że ekspresja katepsyny K jest wyższa w tkankach owrzodzenia niż w zdrowej skórze. Zdaniem doktoranta to może być związane z zaburzoną równowagą między procesami syntezy i degradacji macierzy pozakomórkowej. Dodatkowo wskazuje na zależność, jednak nieistotną statystycznie, pomiędzy ekspresją VEGF i katepsyny K. Wskazywać to może na istnienie związku patofizjologicznego pomiędzy tymi dwoma białkami. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia na dużych grupach chorych i zastosowania technik biologii molekularnej. Doktorant wskazuje zatem słusznie, na potrzebę dalszych badań nad patogenezą owrzodzeń żylnych.

W rozdziale siódmym zatytułowanym zakończenie lek. Paweł Kolano przedstawił w krótki i przejrzysty sposób kluczowe elementy otrzymanych wyników i dyskusji.

Rozdział ósmy zawiera cztery wnioski mające istotną wartość poznawczą, mogące w przyszłości mieć również znaczenie w praktyce klinicznej tzn.:

1. Podwyższone stężenie MMP-1 i MMP-9 w surowicy krwi pacjentów z grupy badanej w porównaniu do grupy kontrolnej świadczy o udziale tych metaloproteinaz w patogenezie owrzodzeń żylnych podudzi.
2. Brak istotnych różnic w stężeniu TIMP-1 między grupą kontrolną a badaną może świadczyć, że w rozwoju owrzodzeń żylnych podudzi przewagę uzyskują procesy proteolityczne.
3. Podwyższone stężenie VEGF i angiogeniny, jak również zwiększona immunohistochemiczna ekspresja VEGF w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej wskazuje, że jednoczesnym zjawiskiem do remodelingu ECM jest proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych.
4. Zwiększona ekspresja katepsyny K w tkankach pochodzących z owrzodzeń żylnych świadczy nie tylko o jej udziale w rozwoju samego owrzodzenia, ale wskazuje też, że może istnieć nowy regulator remodelingu ECM wymagający dalszych badań.

Pozostałe rozdziały zawierają streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo oraz spis rycin i tabel.

Z obowiązku recenzenta muszę wskazać na drobne błędy redakcyjne jak np. niezgodność tytułu rozdziału 6.1 w spisie treści i dyskusji oraz dotyczące cytowanych pozycji piśmiennictwa. W tekście też użyto stwierdzenia „spożywanie tytoniu”, a powinno być palenie. Uwagi te nie mają żadnego wpływu na zawartość merytoryczną pracy.

Lekarz Paweł Kolano dyplom lekarza uzyskał w 1998 roku. Aktualnie jest specjalistą chirurgii ogólnej i pracuje na Oddziale Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej w Tomaszowskim Centrum Zdrowia. Doktorant jest autorem i współautorem ośmiu pełnych publikacji, z których w trzech jest pierwszym autorem. Pięć z tych publikacji umieszczonych jest na Liście Filadelfijskiej.

W podsumowaniu należy podkreślić, że wyniki pracy stanowią istotny wkład w uzupełnieniu wiedzy dotyczącej rozwoju owrzodzeń żylnych. Zaznaczyć należy również, że jej część ma charakter nowatorski, ponieważ w piśmiennictwie jest niewiele doniesień na temat roli np. katepsyny K. W mojej ocenie to bardzo wartościowa część dysertacji, która znalazła swoje odzwierciedlenie we wnioskach. Uzyskane wyniki mogą dodatkowo w przyszłości wpłynąć na codzienną praktykę kliniczną m.in. poprzez poszerzenie liczby czynników rokowniczych. Chciałbym także podkreślić ilość pracy wykonanej przez Doktoranta w trakcie zbierania i opracowywania wyników badań. Zakres całej pracy tzn. zaplanowanie i wykonanie badań, prowadzona dyskusja i opracowane wnioski oraz dorobek naukowy Doktoranta jest w mojej ocenie wystarczający dla uzyskania stopnia doktora nauk medycznych. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Pawła Kolano do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na jakość przeprowadzonych badań oraz w mojej ocenie istotny wkład otrzymanych wyników do poszerzenia wiedzy medycznej dotyczącej patofizjologii owrzodzeń żylnych, którego odzwierciedleniem jest przyjęcie do publikacji części wyników w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem

Witold Owczarek

WOJSKOWY INSTYTUT MEDYCZNY
KLINIKA DERMATOLOGICZNA
Centralnego Szpitala Klinicznego MON
04-141 Warszawa, ul. Szaserów 126
Rejon: 015294487; NIP 113-23-93-22;

KIEROWNIK KLINIKI DERMATOLOGICZNEJ
Centralnego Szpitala Klinicznego MON
Wojskowego Instytutu Medycznego
plk dr hab. n. med. Witold OWCZAREK
profesor nadzwyczajny WIM