

Uchwały 20.06.2018
M. Pomorskie Okręg

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze

Katedra i Zakład Biochemii

Kierownik Katedry Prof. dr hab. n. med. Ewa Birkner
ul. Jordana 19 41-808 Zabrze tel./fax 0-32-272-23-18
e-mail biochemz@sum.edu.pl

OCENA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

mgr Joanny Piechowicz

pt. „Ocena wybranych parametrów metabolomicznych u pacjentów
z przewlekłą chorobą nerek ”

Szacuje się, że roczna zachorowalność w Polsce na przewlekłą chorobę nerek (PChN) wynosi od 4-5 mln. PChN to utrzymujące się powyżej 3 miesięcy nieprawidłowości budowy lub czynności nerek mające znaczenie dla zdrowia. W celu określenia zaawansowania PChN i związanego z nim ryzyka następstw klinicznych, takich jak postęp PChN, konieczność leczenia nerkozastępczego lub zdarzenia sercowo-naczyniowe, stosuje się wielkości GFR oraz wielkość albuminurii. Wielkość GFR szacuje się (eGFR) na podstawie stężenia kreatyniny w surowicy używając odpowiednich wzorów. Natomiast wielkość albuminurii określa się na podstawie wskaźnika albumina/kreatynina w dowolnej próbce moczu lub dobowej utraty albuminy z moczem.

PChN jest wynikiem czynnościowych lub anatomicznych nieprawidłowości różnych struktur nerki; do najczęstszych przyczyn zalicza się nefropatię cukrzycową, nadciśnieniową i niedokrwinną (najczęściej miażdżycową), kłębuszkowe zapalenie nerek, ostre uszkodzenie nerek, cewkowo-śródmiąższowe choroby nerek, wielotorbielowate zwyrodnienie nerek. W miarę postępu tej choroby gromadzą się we krwi toksyny mocznicowe, głównie drobno- i średniocząsteczkowe produkty przemiany białek, czego odzwierciedleniem jest zwiększenie w surowicy stężenia kreatyniny, mocznika i kwasu moczowego. Zmniejsza się natomiast wydzielanie erytropoetyny przez nerki co prowadzi do niedokrwistości oraz 1-hydroksylacja witaminy D, konieczna do powstania jej aktywnej postaci czyli 1,25 (OH)₂D₃ (kalcytriolu), co jest jedną z przyczyn hipokalcemii i wtórnej nadczynności przytarczyc. Ponadto może się pojawić nieprawidłowa glikemia na czczo lub nieprawidłowa tolerancja glukozy-główne przyczyny to insulinooporność i zwiększona glukoneogeneza, dyslipidemia - hipertriglicerynemia, zmniejszenie stężenia cholesterolu HDL, rzadziej wzrost stężenia cholesterolu LDL jak również niedożywienie białkowo-energetyczne. Nerki również tracą zdolność do utrzymywania homeostazy środowiska wewnętrznego; prawidłowej wolemii, składu elektrolitowego i pH krwi.

Przeprowadzenie właściwej diagnostyki PChN i poszukiwanie nowych metod diagnostycznych jest niezwykle istotne z dwóch punktów a mianowicie, klinicznego i socjalno/ekonomicznego. Narastanie bowiem nieprawidłowości metabolicznych w przebiegu PChN może prowadzić do poważnego upośledzenia wrastania dzieci i młodzieży jak również powikłań sercowo-naczyniowych i zwiększonej śmiertelności.

Metabolomika i proteomika to stosunkowo nowa rozwijająca się pręźnie dziedzina biologii pozwalająca na identyfikację i analizę ilościową molekuł poniżej 900 Da w komórkach

oraz tkankach różnych organizmów. Za pomocą oceny metabolitów (metabolomika) oraz białek/peptydów (proteomika) na poziomie tkanek i komórek możliwa jest ocena stężenia wybranych metabolitów, których ilość ulega modyfikacji na skutek zmian chorobowych. Dlatego dzięki ww. technikom możliwe jest odkrycie nowych biomarkerów dla różnych jednostek chorobowych w tym m.in. PChN, które pozwalają na dokładne i wczesne wykrycie patologii w zakresie nerek, co ma kluczowe znaczenie u dzieci w ich przyszły rozwoju.

Dlatego temat podjęty przez Doktorantkę jest tematem aktualnym i zapewne wymagającym ciąglej weryfikacji nowych metod ułatwiających szybką diagnostykę PChN.

Charakterystyka ogólna pracy

Przedstawiona mi do oceny dysertacja ma układ typowy dla prac doktorskich. Rozprawa liczy 133 strony i składa się wykazu skrótów oraz następujących rozdziałów: wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, streszczenia w języku polskim, wniosków, streszczenia w języku angielskim, spisu tabel i rycin oraz piśmiennictwa. Zawiera 224 pozycji bibliografii, 26 tabel i 19 rycin. Praca jest przejrzysta i starannie sformatowana. Zawiera drobne błędy edytorskie (str. 19, 25, 46, 49, 101).

Wstęp

Wstęp liczy 45 stron i został podzielony na sześć części. Doktorantka przedstawiła w nim w sposób bardzo staranny i merytoryczny klasyfikację oraz definicję przewlekłej choroby nerek jak również wskaźniki czynności nerek takie jak kreatynina i szacownie przesączania kłębuszkowego. Znaczącą pozycję we wstępie zajmuje opis nowych markerów PChN takich jak: lipokaina obojętnochłonna związana z żelatynazą neutrofilów, asymetryczna i symetryczna dimetyloarginina, uromodulina, cząsteczka -1 uszkodzenia nerek KIM-1. Bardzo istotną częścią wstępu jest podrozdział dotyczący markerów oznaczonych za pomocą metod metabolomicznych i proteomicznych jak również podrozdział opisujący wybrane zagadnienia kliniczne w PChN. Cennym dopełnieniem tej części pracy jest 6 rycin i 10 tabel obrazujących informacje zawarte w tym rozdziale. Doktorantka w podrozdziale 2.5.1. i 2.5.2 opisuje odpowiednio metody oznaczania ADMA i powiązanych z nią metabolitów u pacjentów z PChN w mojej opinii informacje zawarte na stronach 48-50 są w tym rozdziale zbędne.

Cel pracy

Celem nadrzędnym rozprawy była ocena wybranych parametrów metabolomicznych w osoczu i erytrocytach u pacjentów z różnym stopniem zaawansowania przewlekłej choroby nerek oraz poszukiwanie ewentualnych związków pomiędzy tymi parametrami, a rozwojem przewlekłej choroby nerek. Aby zrealizować cel główny Doktorantka wyznaczyła sobie 5 celów cząstkowych, m.in.: dotyczących stężenia metabolitów NO i NAD w erytrocytach dzieci z przewlekłą chorobą nerek; czy istnieje związek pomiędzy stężeniem metabolitów NO i NAD a rozwojem przewlekłej choroby nerek oraz czy modyfikacja metody w zakresie analizy krwinek czerwonych do pomiaru metabolitów nukleotydów może być skuteczna/miarodajna do oznaczeń ilościowych wspomnianych parametrów w specyficznej matrycy jaką są erytrocyty ludzkie?

Cel główny jak również cele cząstkowe w mojej opinii zostały prawidłowo sformułowane

Materiał i Metody

Rozdział ten stanowi 16 stron maszynopisu. Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje w nim metodyki badań oraz charakteryzuje grupy, od których został pozyskany materiał do badań. Do badania zakwalifikowano 48 dzieci z różnym stopniem przewlekłej choroby nerek i grupę kontrolną składającą się z 33 zdrowych dzieci. W pobranej krwi oznaczono metabolity związane nukleotydami oraz metabolity związane z arginina z wykorzystaniem chromatografu

cieczowego sprzężonego z spektrometrem masowym. Na szczególną uwagę zasługuje fakt bardzo szczegółowego opisanie metod badawczych, które zostały opracowane na macierzystej Katedrze Doktorantki, co niewątpliwie jest wielkim atutem pracy. Zastosowane procedury badawcze cechują się bardzo wysoką czułością i dokładnością.

Wyniki

Uzyskane wyniki Doktorantka opracowała statystycznie używając programu STATISTICA wersja 8 oraz arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel. Zastosowane metody statystyczne zostały właściwie dobrane.

Uzyskane dane Doktorantka przedstawiła na 24 stronach maszynopisu. Zobrazowane one zostały w postaci tabel i rycin. Ryciny 11-15 obrazują chromatogramy i widma masowe identyfikowanych związków, a ryciny 16-19 krzywe kalibracyjne. Wyniki badań grupy badanej i kontrolnej przedstawiono w 2 tabelach (15 i 16), które dla czytelności powinny być połączone w jedną. Analizę podgrup z przewlekłą chorobą nerek przedstawiono na rycinach, a ich analizę statystyczną w kolejnej tabeli. Warto nanieść znamienności statystyczne na ryciny, co ułatwiłoby interpretację wyników. Opisy tabel 19-23 sugeruje różnice badanych parametrów (GFR, stężenie kreatyniny, mocznika, ADMA i NAD), natomiast w tabelach podane są wartości bezwzględne. Dobrym uzupełnieniem przeprowadzonych analiz jest syntetyczne zawarcie współczynników korelacji w tabelach 24 i 25 w grupie badanej. Czy podobne zależności były w grupie kontrolnej?

Dyskusja i wnioski

Dyskusja przeprowadzona jest w sposób bardzo dojrzały i świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i umiejętności analizy. Autorka porównuje wyniki własne z innymi badaczami. Podkreśla, że w praktyce klinicznej u pacjentów nefrologicznych wykorzystuje się głównie stężenie kreatyniny w surowicy, służące oszacowaniu GFR natomiast wielkość klirensu kreatyniny endogennej odzwierciedla funkcję nerek i służy do rozpoznania PChN, określa stopień jej zaawansowania jak i monitorowania leczenia. Jednakże kreatynina, mocznik, mikroalbuminuria jako klasyczne biomarkery stosowane do oceny czynności nerek wykazują wady przede wszystkim są to parametry o niskiej czułości detekcji. Natomiast wczesne wykrycie przewlekłej choroby nerek w oparciu o mikroalbuminurię czy pomiar cystatyny C nie znajduje również zastosowania w gabinecie POZ-u. Stąd próba identyfikacji biomarkera jednoznacznego dla PChN, który charakteryzowałby się wysoką skutecznością wykrywania patologicznych zmian przyczyniających się do wczesnego zdiagnozowania niewydolności nerek w szczególności u dzieci.

Podczas rozwoju choroby dochodzi w organizmie do zaburzeń nieustannie przebiegających procesów biochemicznych na różnym ich poziomie, które można wykryć za pomocą wysokoprzepustowych, m.in. spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) czy spektrometrii mas (MS), które stanowią podstawę rozwoju badań metabolomicznych. PChN związana jest ze zmianami patofizjologicznymi, obejmującymi m. in. drogi metaboliczne arginina-kreatyna, metylacja argininy, cykl mocznikowy czy glikolizę. Stąd podjęte przez Doktorantkę analizy wybranych metabolitów związanych z cyklem arginina - kreatynina, cyklem mocznikowym, drogami metabolicznymi metylacji argininy oraz z NAD i związanych z nim metabolitów u dzieci z PChN za pomocą techniki LC-QTOF-MS.

Autorka podkreśla, że jest niewiele prac dotyczących metabolomiki PChN u dzieci stąd wybór tej grupy wiekowej do niniejszej rozprawy.

W wyniku przeprowadzonej analizy metabolitów związanych z cyklem arginina - kreatynina, cyklem mocznikowym, drogami metabolicznymi metylacji argininy Doktorantka wykazała istotne statystycznie różnice dla ADMA, SDMA, DMA i cytruliny między grupą pacjentów pediatrycznych a grupą kontrolną. Sugeruje, że występowanie różnic

statystycznych dla badanych parametrów związanych z arginina może być powiązane bezpośrednio z metabolizmem NO, któremu przypisuje się działanie przeciwzapalne, wazodylatacyjne, antyadhezyjne oraz antyproliferacyjne, co ma istotne znaczenie dla zmian chorobowych obserwowanych w PChN.

Istnieje związek pomiędzy metabolizmem nukleotydów i metabolitami argininy. Wszystkie izoformy syntazy tlenku azotu NOS wykorzystują argininę i tlen cząsteczkowy jako substraty oraz wymagają kofaktorów w postaci m.in. zredukowanego NADPH. Zwiększone stężenie ADMA u pacjentów z PChN jest wynikiem hamowania syntezy NO. Z kolei SDMA wykazuje słabe działanie hamujące NOS, natomiast może zakłócać syntezę NO w sposób pośredni poprzez konkurowanie z arginina w transporcie odbywającym się przez komórki membrany. Stąd podjęta przez Doktorantkę próba oznaczania metabolitów związanych z nukleotydami co jest niewątpliwie atutem niniejszej dysertacji. W wyniku przeprowadzonej analizy w erytrocytach Autorka nie wykazała różnic istotnych statystycznie dla NAD, NA, NAM, NADH, NAAD, NAMN oraz NMN pomiędzy PChN dziećmi a grupą kontrolną, sugeruje, że analizę należałoby wykonać na większej populacji.

W dyskusji pojawiają się obszernie fragmenty omawiające wyniki (str. 99, 102). W mojej sugestii powinny być one umieszczone w rozdziale : Wyniki.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki wydają się być pomocne w lepszym zrozumieniu zależności pomiędzy metabolizmem poszczególnych analitów biorących udział w różnych cyklach biochemicznych oraz przybliżają skomplikowany patomechanizm profilów metabolicznych przewlekłej choroby nerek. Wydaje się, że wielowymiarowa analiza danych dotyczących osoczowego stężenia metabolitów cyklu mocznikowego, metylacji argininy i szlaków metabolicznych argininy i kreatyniny w pediatrii będzie pomocne przy klasyfikacji dziecka do określonego stadium choroby z 74%, dokładnością przy obecnie nawet 90% błędnych rozpoznaniach przez lekarza (o jedno stadium powyżej lub poniżej) zaawansowania PChN.

Zaproponowane przez Doktorantkę wnioski: 1,2,4 oraz 5 są raczej podsumowaniem wyników natomiast pozostałe zostały sformułowane prawidłowo i odpowiadają celom pracy. Ponadto są one zdublowane - występują na stronie 108 i 113.

Piśmiennictwo

Dołączone piśmiennictwo jest prawidłowo cytowane. Składa się z 224 pozycji z czego z ostatnich pięciu lat (2018-2013) stanowi 33% cytowań.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja zawiera oryginalną i nowatorską koncepcję naukowo-badawczą. Ponadto świadczy o doskonałym warsztacie Doktorantki. Doktorantka podkreśla, że uzyskane w rozprawie doktorskiej wyniki nie pozwoliły wyłonić specjalnych cech jakimi powinien oznaczać się idealny biomarker dla rozpoznania PChN w jej początkowych stadiach natomiast pozwoliły wykazać skuteczność metody do oznaczeń metabolitów NO, a przez to znaleźć praktyczne zastosowanie dla tej procedury badawczej w diagnostyce laboratoryjnej. Dlatego wydaje się, że jest istnieje konieczność dalszych badań metabolicznych, które mogą się przyczynić do identyfikacji patognomicznych biomarkerów PChN, które wejdą w podstawowy panel badań.

Rozprawa doktorska 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 (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Wymienione wyżej uwagi w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości i oryginalności dysertacji i są jedynie wskazówkami do dalszych publikacji.

Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie **mgr Joanny Piechowicz** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

14.06.2018

ADIUNKT
Katedry i Zakładu Biochemii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
A. Kasperczyk
dr hab. n. med. Aleksandra Kasperczyk

.....
dr hab. n. med. Aleksandra Kasperczyk