

Woln 20.06.2018  
M. Podwojska-Elisfor

## Recenzja rozprawy doktorskiej

### **mgr Joanny Piechowicz pt. „Ocena wybranych parametrów metabolomicznych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek”**

Przewlekła choroba nerek (PChN) to zespół chorobowy będący wynikiem nieodwracalnego uszkodzenia lub zmniejszenia liczby czynnych nefronów. Etiopatogeneza tego schorzenia jest złożona. U dorosłych jest ono najczęściej skutkiem cukrzycy czy nadciśnienia tętniczego, a w populacji pediatrycznej-wrodzonych wad układu moczowego. Między innymi z tych powodów, PChN należy do powszechnych i cywilizacyjnych schorzeń człowieka, o chorobowości pomiędzy 7 a 16%. Szacuje się, że tylko w Polsce dotyczy ona nawet 4 milionów osób, stąd ok. 20 tysięcy pacjentów leczonych nerkozastępczo w naszym kraju stanowi swoisty „wierzchołek góry lodowej” tego problemu. Nie ulega więc wątpliwości, że PChN stanowi ogromne wyzwanie organizacyjne i finansowe dla każdego współczesnego systemu ochrony zdrowia. Wraz z progresją tego schorzenia nasilają się problemy kliniczne związane z upośledzeniem funkcji nerek, w tym istotnie zwiększa się ryzyko śmiertelności. Faktem jest, że wczesna diagnostyka PChN jest podstawowym warunkiem wdrożenia właściwej terapii i poprawy losu chorych poprzez spowolnienie naturalnego jej przebiegu. Z perspektywy czasowej, ma to szczególne znaczenie u dzieci. Współczesne metody rozpoznania uszkodzenia nerek opierają się zazwyczaj na laboratoryjnej ocenie poziomu kreatyniny i/lub cystatyny C w surowicy i oszacowaniu na ich podstawie wielkości filtracji kłębuszkowej. Wiadomo jest jednak, że parametry te mają w tym względzie ograniczenia, szczególnie w odniesieniu do ich czułości we wczesnym rozpoznaniu uszkodzenia nerek. Dlatego też trwają badania nad znalezieniem nowych, istotnie lepszych markerów biochemicznych, które znalazłyby zastosowanie w praktyce klinicznej.

Przykładem takich poszukiwań jest przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Joanny Piechowicz, dotycząca oceny wybranych parametrów metabolomicznych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Autorka korzystając z niedawnych odkryć metabolomiki i proteomiki poddała analizie kilka substancji-kandydatów na markery wczesnego wykrywania i oceny progresji PChN, jak osoczowe poziomy związków metabolizmu argininy, w tym samej argininy, asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), symetrycznej dimetyloargininy (SDMA), dimetyloargininy (DMA) i cytruliny oraz stężenia w erytrocytach metabolitów

dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, w tym jego formy utlenionej (NAD) i zredukowanej (NADH), mononukleotydu kwasu nikotynowego (NAMN), mononukleotydu  $\beta$ -nikotynamidu (NMN), dinukleotydu adeninowego kwasu nikotynowego (NAAD), kwasu nikotynowego (NA) i nikotynamidu (NAM). Zważywszy na praktyczny, aktualny i nowatorski charakter, zwłaszcza w odniesieniu do dzieci, uważam podjęty temat badawczy za w pełni uzasadniony.

Praca ma typowy układ, obejmujący wstęp, cel, materiał i metody, wyniki badań i ich omówienie, dyskusję, ostateczne wnioski, piśmiennictwo oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Uzupełnieniem jest wykaz skrótów, rycin i tabel.

We wstępie, stanowiącym wprowadzenie do dalszych części rozprawy Autorka w przystępny sposób przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący problematyki PChN, w tym definicję, klasyfikację oraz aspekty kliniczne, metody oceny czynności nerek oraz nowe markery PChN. Ponadto szczegółowo omówiła fizjologiczne przemiany badanych w pracy metabolitów argininy i dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego oraz ich znaczenie w procesach patologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem PChN. Doktorantka poruszyła również aspekty metodologiczne ich oceny. Wykazała się przy tym bardzo dobrą znajomością poruszanych zagadnień w oparciu o doświadczenie analityczne i najnowsze piśmiennictwo. Na uwagę zasługują starannie przygotowane ryciny i tabele, które ułatwiają zapoznanie się z badanym problemem.

Cel pracy został sformułowany poprawnie, wielowątkowo i obejmował ocenę osoczowych poziomów związków metabolizmu argininy oraz stężeń w erytrocytach metabolitów dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego u pacjentów pediatrycznych z PChN, jak również ich potencjalnego związku z postępem tego schorzenia. Ponadto dodatkowym celem była analiza użyteczności zastosowanej autorskiej i nowatorskiej metody analitycznej dla oznaczeń metabolitów dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w erytrocytach.

Badaniami objęto grupę 48 pacjentów pediatrycznych, w tym 16 dziewczynek i 32 chłopców w wieku od 3 do 18 lat z PChN o różnej etiologii w stadiach od II do V, w tym hemodializowanych i dializowanych otrzewnowo. Grupę kontrolną stanowiło 33 zdrowych dzieci porównywalnych wiekowo.

Autorka bardzo dokładnie opisała teoretyczne podstawy i procedury zastosowanych metod analitycznych wykonanych w oparciu o chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią masową. Posłużyła się przy tym starannie

przygotowanymi rycinami i tabelami. Tak szczegółowy opis metodologiczny znajduje swoje uzasadnienie w zastosowaniu autorskich i nowatorskich metod analitycznych. Doktorantka przedstawiła również opis użytych metod statystycznych.

W kolejnej części rozprawy zostały umieszczone wyniki badań, zaprezentowane w formie opisowej, graficznej i tabelarycznej.

Rozprawa zawiera interesującą dyskusję, konfrontującą uzyskane wyniki z wynikami badań innych autorów. Umiejętność formułowania opinii oraz krytyczna analiza zastosowanych, autorskich metod analitycznych świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Podsumowaniem pracy jest 8 wniosków.

Na uwagę zasługuje właściwie dobrane, prawie wyłącznie anglojęzyczne piśmiennictwo, opublikowane w zdecydowanej większości w ostatnich latach. Dowodzi to o aktualności zagadnień będących przedmiotem rozprawy.

Mimo, że w ogólnej ocenie praca napisana została bardzo poprawnie, zawiera jednak pewną liczbę uchybień, które w mojej opinii wymagają poprawy bądź wyjaśnienia.

1. W tytule pracy sugerowałbym doprecyzowanie, że badania dotyczyły pacjentów pediatrycznych.

2. Wstęp pracy wydaje się być zbyt obszerny w stosunku do pozostałych części rozprawy i mógłby ulec znaczącemu skróceniu poprzez podawanie konkretnych faktów i unikania stylu o charakterze dyskusji. Dotyczy to przede wszystkim podrozdziałów poświęconych markerom PChN i metodologii ich oznaczania. We wstępie znajduje się również pewna liczba drobnych błędów merytorycznych, np. użycie określenia proteaza w stosunku do cystatyny C, nieprawidłowe określenie „górną część pętli Henlego” jako miejsca syntezy uromoduliny, czy wyrażenie „3- monooksygenaza kinureninowa (KMO) genu (Kmo)”. Doprecyzowania wymagają niektóre informacje, np., że cystatyna C może być potencjalnym markerem dysfunkcji kanalików nerkowych ale jedynie przy oznaczaniu jej w moczu, a NGAL ulegać może sekrecji kanalikowej tylko w przypadku ostrego uszkodzenia nerek.

3. Użycie określenia „metabolity NO” w odniesieniu do części badanych związków, w tym ADMA i SDMA uważam za mylące, gdyż sugeruje, że są one produktami przemian tlenu azotu, a są one przecież modulatorami jego syntezy. Dlatego w odniesieniu do tej badanej grupy związków właściwsze jak sądzę, byłoby

użycie określenia „związane z metabolizmem argininy”, co zresztą Autorka niekiedy stosuje.

4. Sądzę, że w 2 i 4 celu pracy, lepiej byłoby użyć określenia. „postęp PChN” zamiast „rozwój PChN” co lepiej oddawałoby istotę założeń przeprowadzonych badań.

5. W części metodologicznej nie sprecyzowano analitycznej metody oznaczania poziomu kreatyniny w surowicy, co ma znaczenie w świetle użytego wzoru do oszacowania eGFR. Ponadto brak jest informacji w odniesieniu do metodologii, powodu wykonania i przedstawienia w kolejnym rozdziale wyników innych podstawowych parametrów laboratoryjnych krwi jak mocznik, CRP i niektóre elektrolity.

6. Rozumiem, że zastosowanie nieparametrycznych testów statystycznych wynikało z nie- normalnego rozkładu badanych zmiennych, co nie zostało jednak jasno stwierdzone. Skoro tak, to ich wartości powinny być przedstawiane jedynie jako mediana i zakres wartości skrajnych. Dotyczy to zarówno części opisowej, tabelarycznej i graficznej.

7. W rozdziale dotyczącym wyników, podobnie jak we wstępie, niepotrzebnie pojawiają się fragmenty o charakterze dyskusji, a także dywagacje metodologiczne. Omawiając wyniki Autorka nie zawsze doprecyzowuje na czym dokładnie polegały różnice stwierdzone pomiędzy grupami i jaki był poziom istotności. Ułatwiłoby to czytelnikowi zapoznanie się z treścią. Z uwag technicznych, dla uproszczenia, tabele 15 i 16 proponowałbym połączyć w jedną. Poprawić należy nieprecyzyjny podpis ryciny błędnie określonej jako tabela 17, a na odpowiednich jej wykresach zaznaczyć ujawnione istotne statystycznie różnice. W podpisach tabel 19-32 proponowałbym słowo „różnice” zastąpić słowem „wartości” co lepiej oddaje zawartą w nich treść. Ponadto z podpisów tabel 24- 25 zmieniałbym wyrażenie „przedstawia korelację” na „analizę korelacji”.

8. Ogólna uwaga odnosząca się do dyskusji dotyczy nieco ostrożniejszej interpretacji uzyskanych wyników, zwłaszcza przy braku istotności statystycznych dla dokonanych porównań. Stąd proponowałbym w takich przypadkach unikanie określeń typu „drastyczne obniżenie” „gwałtowny wzrost” i nieco oszczędniejsze używanie przysłowka „niewątpliwie”. Ponadto we fragmencie tego rozdziału dyskutowane są wyniki osoczowych stężeń argininy w zależności od stadiów PChN, mimo, że w wcześniejszym rozdziale, dedykowanemu wynikom, takich danych brak. Wymaga to uzupełnienia.

9. Liczba końcowych wniosków mogłaby być ograniczona, biorąc pod uwagę założone cele. Dotyczy to zwłaszcza wniosku 7, ponadto wniosek 6 jest zbyt daleko idący w świetle uzyskanych wyników.

10. Poprawy wymaga pewna liczba błędów literowych. Niektóre z nich mają charakter powtarzalny w odniesieniu do nazw związków chemicznych jak. np. lipokaina zamiast lipokalina.

Chciałbym podkreślić, że powyższe uwagi mają w większości charakter prawie wyłącznie stylistyczno- edytorski, stąd nie umniejszają merytorycznej wartości pracy, która stanowi cenny wkład do badań nad poszukiwaniem nowych biomarkerów PChN. Dysertacja dostarcza również nowatorskiej metodologii, która z pewnością posłuży jako warsztat do dalszych poszukiwań naukowych, do czego Doktorantkę serdecznie zachęcam.

W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego też mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Joanny Piechowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. n.med. Przemysław Sikora

Lublin 12. czerwca 2018 r.