

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
I KLINIKA NEFROLOGII I
TRANSPLANTOLOGII Z OŚRODKIEM DIALIZ

15-540 Białystok ul. Żurawia 14, tel.: (085) 7409458, fax: (085) 7434586, e-mail: bnaumnik@poczta.onet.pl

Białystok, 15.07.2020

Opinia
o dysertacji doktorskiej pt.
**Ocena klinicznego zastosowania wybranych markerów białkowych
oznaczanych w moczu u chorych z cukrzycową chorobą nerek w przebiegu
cukrzycy typu drugiego.**

Autorstwa lek. Katarzyny Rybak
Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Marka Kuźniewskiego

Problem wczesnej diagnostyki powikłań nerkowych w cukrzycy jest nadal bardzo aktualny, ponieważ pomiar albuminurii, uznanego markera uszkodzenia drobnych naczyń, nie zawsze jest markerem wystarczającym. Cukrzycowa choroba nerek (CChN) stanowi najczęstszą przyczynę schyłkowej niewydolności tego narządu zarówno w Polsce jak i na świecie oraz jest najczęstszą przyczyną konieczności podjęcia leczenia nerkozastępczego. CChN kilkudziesięciokrotnie zwiększa ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych wpływając tym samym bezpośrednio na dużą śmiertelność w tej grupie chorych. Albuminuria jest uznanym czynnikiem ryzyka progresji choroby nerek i zdarzeń sercowo-naczyniowych. Jednak, jak słusznie zauważyła Doktorantka, u części chorych utrata funkcji filtracyjnej nie musi być poprzedzona wzrostem albuminurii, w związku z czym poszukuje się nieustannie innych markerów laboratoryjnych wczesnych stadiów CChN.

Przedmiot podjętych przez Doktorantkę badań jest więc nie tylko ciekawy ale i całkowicie uzasadniony - zarówno z uwagi na aspekty poznawcze, jak i codzienną praktykę kliniczną.

Monografia wraz z piśmiennictwem liczy 113 stron druku. Posiada typowy dla dysertacji doktorskich układ. Obszerny wstęp poprzedzony jest spisem treści i wykazem skrótów.

We *Wstępie* Autorka przybliży epidemiologię i patogenezę cukrzycowej choroby nerek, jej przebieg kliniczny oraz patomorfologiczny obraz zmian w nerkach w przebiegu długo trwającej cukrzycy typu 2 (T2DM). Charakteryzuje również definicję i znaczenie kliniczne albuminurii oraz szczegółowo przedstawia całą paletę innych białek wydalanych z moczem, mogących świadczyć o uszkodzeniu nerek takich jak: cystatyna C, uromodulina, KIM-1, transferryna, NGAL, beta2-mikroglobulina, wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe, rozpuszczalna forma receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu, MMP-9 oraz IgG. Następnie przybliży aspekty procedur diagnostycznych oznaczania powyższych białek ze szczególnym zwróceniem uwagi na techniki elektroforetyczne w tym elektroforezę białek z użyciem siarczanu dodecyłu sodu (SDS-PAGE). W tym miejscu chciałabym jedynie zwrócić uwagę na stronę 8, gdzie w pierwszym akapicie wstępu czytamy: „W jej (CChN) przebiegu dochodzi do strukturalnych lub czynnościowych nieprawidłowości w zakresie nerek” z czym trudno się zgodzić, ponieważ procesy te idą w parze, a zmiany strukturalne zazwyczaj wyprzedzają zmiany czynnościowe. Wydaje się więc bardziej poprawne zastąpienie słowa „lub” spójnikiem „i”. Z kolei na stronie 15 znajduje się niefortunna informacja, że do ekspozycji KIM-1 dochodzi w części szczytowej cewek, co zapewne odnosi się do części szczytowej komórek nabłonka cewek. Niemniej jednak, *Wstęp* napisany jest zwięźle, logicznie i bardzo przystępnie. Jest dobrym wprowadzeniem czytelnika w pryncypia problematyki rozwiniętej w dalszej części pracy.

Założenia i cel pracy, podane w sposób zwięzły, syntetyczny i logiczny, wypływają z rozważań zawartych we wstępie. Autorka wytycza, jako główne zadania, ocenę użyteczności diagnostycznej oznaczania wybranych białek w surowicy i moczu oraz badania elektroforezy SDS-PAGE białek moczu w diagnostyce CChN u chorych z T2DM. W szczególności Doktorantka skupiła się na korelacji wyników elektroforezy białek w moczu z parametrami powszechnie używanymi do oceny funkcji nerek, zbadaniu związku tych białek z powikłaniami mikro- i makroangiopatycznymi T2DM, wybranymi danymi demograficznymi, klinicznymi i laboratoryjnymi (w tym ze stopniem wyrównania i stopniem zaawansowania cukrzycowej choroby nerek). Jako cel wytyczyła sobie także ocenę przydatności diagnostycznej oznaczeń transferryny, IgG i beta2-mikroglobuliny w moczu u chorych z CChN. Założenia pracy są jasne i logiczne i nie nastroczają wątpliwości.

Materiał do badań stanowiła grupa 117 pełnoletnich chorych z rozpoznaną T2DM

zgłaszających się Poradni Nefrologicznej Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie. Okres badania wynosił 12 miesięcy. Kryteria kwalifikacji i dyskwalifikacji pacjentów zostały precyzyjnie określone.

Metodyka badań laboratoryjnych została przedstawiona z dużą skrupulatnością, z podaniem kolejnych etapów badania, od momentu zebrania dokładnego wywiadu od chorego do ostatecznego opracowania materiału. Dokładnie zostały opisane także wszystkie użyte do przetwarzania danych kalkulatory i wskaźniki medyczne, metody pozyskiwania i przechowywania materiału, a także metody badań laboratoryjnych z uwzględnieniem wartości referencyjnych badanych parametrów we krwi i moczu. Precyzyjnie opisano badania biochemiczne i immunochemiczne, podając zakresy wartości referencyjnych z uwzględnieniem płci (tam, gdzie to było możliwe). Potwierdzam zasadność i poprawność zastosowanych technik badawczych.

Metody analizy statystycznej zastosowane w pracy są starannie dobrane i adekwatne zarówno do założeń jak i obranych technik.

Wyniki badań Autorka przedstawiła na 40 stronach, co zajmuje około 43% tekstu całej dysertacji. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci opisowej oraz zilustrowane 24 tabelami i 14 rycinami. Zwraca uwagę wielka staranność opracowania i bardzo ładna forma graficzna. Wyniki badań są bardzo ciekawe i dotyczą w znamienitej przewadze (98%) pacjentów z dobrze kontrolowaną cukrzycą typu 2 ($HbA1c \leq 7\%$), dobrze zachowaną funkcją nerek ($eGFR > 45 \text{ ml/min/1.73m}^2$) i, w większość, niskim wskaźnikiem uACR ($< 30 \text{ mg/g}$). U blisko 1/5 chorych w rozkładzie elektroforetycznym białek moczu nie wykryto obecności białka, u ok. 62% badanych obserwowano jedynie śladową ilość albuminy, natomiast białkomocz kłębuszkowy lub kłębuszkowo-cewkowy zdiagnozowano u 18% pacjentów. W badanej grupie nie obserwowano białkomoczu cewkowego. Wyniki elektroforezy białek moczu korelowały ze stężeniem albuminy w moczu i wartością uACR. W toku badania wykazano szereg interesujących związków między nasileniem albuminurii i białkomoczu a stężeniem białek specyficznych mierzonych w moczu chorych (uKIM-1, uNGAL, uIgG i uTRF, słabsze korelacje z uUMOD i uL-FABP). W ocenie wyników elektroforezy białek moczu zwrócono uwagę na obecność prążka uromoduliny u ok. 1/3 badanych chorych, którzy jednocześnie mieli najczęściej śladową albuminurię. Dodatkowo obserwowano dodatnie

korelacje między uACR, a stężeniem sCysC i uPAR w surowicy. W podgrupach chorych wyodrębnionych w oparciu o rutynowo wyliczany eGFR nie wykazano różnic dotyczących stężeń białek specyficznych w moczu (wyjątek – sUMOD, sCysC). Jedynie stężenia uKIM-1 korelowało ujemnie z wielkością eGFR. Zaskakujące jest, że jedynie ulgG wykazywała korelację z czasem trwania cukrzycy. Wykazano ważne zależności między stopniem wyrównania cukrzycy a rodzajem białkomoczu w ocenie elektroforetycznej. Oceniono także związki między wynikami badań laboratoryjnych a obecnością powikłań cukrzycy, chociaż zdiagnozowaną retinopatię miało jedynie 14 osób. W grupie tej wykazano wyższe stężenie uL-FABP i wyższe wartości uUMOD/uCR w porównaniu do pacjentów bez retinopatii. Z kolei u chorych z powikłaniami sercowo-naczyniowymi, u których stwierdzono niższy eGFR i wyższe wartości uACR, wykazano wyższe stężenie uPAR i sUMOD oraz wyższy wskaźnik KIM-1/Cr w moczu. Niektóre z białek korelowały z wykładnikiem ostrej fazy, jakim jest CRP, natomiast znakomita ich większość wykazywała związek z nasileniem dyslipidemii.

Na podkreślenie zasługuje fakt bardzo systematycznego i konsekwentnego opracowania wyników, które w związku z mnogością badanych czynników, na pewno nie było zadaniem łatwym.

Dyskusja, to dość istotny rozdział monografii. Autorka skupia się tu przede wszystkim na własnych spostrzeżeniach wynikających z przeprowadzonych badań i wykazaniu podobieństwa lub niespójności wyników i opinii badaczy zajmujących się podobną problematyką. Przeprowadzone badanie jest w pewnym sensie unikatowe z uwagi na fakt, iż jak dotychczas nie rozpatrywano elektroforetycznego oznaczania białek w moczu w kontekście jego przydatności jako nowego wskaźnika uszkodzenia nerek u chorych z różnym stopniem ciężkości CChN. Nawet pomimo udokumentowanego przez Autorkę braku użyteczności tej metody we wczesnej diagnostyce powikłań cukrzycy typu 2 obserwacja ta stanowi cennym wkład w poszukiwaniu wczesnych markerów uszkodzenia nerek, co zostało słusznie podkreślone w dyskusji. Bardzo ciekawa jest również dywagacja na temat fenotypu CChN bez zwiększonej albuminurii i związków badanych białek z eGFR ocenianym na podstawie stężeń kreatyniny i cystatyny C w surowicy. Autorka pracy pozostawia ten temat otwartym, zwracając jednocześnie uwagę na dużą użyteczność oznaczania stężenia cystatyny w surowicy jako wcześniejszego niż kreatyninemia markera uszkodzenia strukturalnego nerek. Cennym fragmentem dyskusji jest również analiza związku badanych

białek z klinicznymi wykładnikami rozwoju i progresji CChN, z uwzględnieniem ich podziału na czynniki modyfikowalne i niemodyfikowalne.

Krótkie ustosunkowanie się Autorki do ograniczeń przeprowadzonego badania świadczy o pełnej świadomości trudności interpretacyjnych uzyskanych wyników i dojrzałości badawczej. Myślę, że największym ograniczeniem przedstawionej pracy jest fakt niemożności przeprowadzenia wszystkich oznaczeń w całej, zakwalifikowanej do badania grupie. Idealnym rozwiązaniem byłoby również przeprowadzenie diagnostycznej biopsji nerki, co jednak wymyka się aktualnym algorytmom diagnostycznym dotyczącym postępowania w cukrzycy.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań Doktorantka podała w formie opisowej, co nie jest do końca satysfakcjonujące, ponieważ nie stanowią one bezpośredniej odpowiedzi na założenia i cele pracy. Odnoszę wrażenie, że trudnością w ich sformułowaniu była ich rozciągłość i brak jednoznacznego trendu. Doktorantka zwraca jedynie uwagę na przydatność analizy białek specyficznych w surowicy i moczu oraz analizy elektroforetycznej SDS-PAGE białek moczu w diagnostyce i różnicowaniu CChN u chorych z T2DM, a także w monitorowaniu skuteczności terapii i rozwoju powikłań cukrzycowych. Na przykładzie oznaczeń cystatyny C w surowicy Autorka postuluje również wykorzystywanie w diagnostyce chorych z T2DM parametrów o udowodnionej już wysokiej przydatności we wczesnej ocenie rozwijających się powikłań, w tym powikłań sercowo-naczyniowych

Dla porządku dodam, że piśmiennictwo liczy 128 pozycji i w zdecydowanej większości pochodzi z ostatniego dziesięciolecia. Załączony spis tabel, załączników i rycin oraz indeks skrótów stanowczo ułatwia czytanie pracy. Streszczenia w języku polskim i angielskim liczą po 2 strony, są rzeczowe i merytoryczne, co również ułatwia zapoznanie się z problemem.

Moje podsumowanie dysertacji, którą miałam przyjemność recenzować jest jednoznaczne. Temat pracy, bardzo aktualny i pożyteczny z punktu widzenia praktyki lekarskiej, jest bardzo dobrze wybrany. Jego realizację przeprowadzono starannie, z wykorzystaniem prawidłowego warsztatu badawczego. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą, którą poparła aktualnym piśmiennictwem, trafnie wykorzystanym we wstępie, metodyce i dyskusji.

Równie jednoznaczny jest mój wniosek końcowy: praca pt. „Ocena klinicznego

zastosowania wybranych markerów białkowych oznaczanych w moczu u chorych z cukrzycową chorobą nerek w przebiegu cukrzycy typu drugiego” autorstwa lek. Katarzyny Rybak wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Marka Kuźniewskiego spełnia wszystkie kryteria przewidziane odpowiednią ustawą wymagane na stopień doktora nauk medycznych.

W związku z powyższym składam na ręce Pana Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie wniosek o dopuszczenie lek. Katarzyny Rybak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. n. med. Beata Naumnik

A handwritten signature in black ink, reading "Beata Naumnik". The signature is written in a cursive, flowing style with some stylized loops and flourishes.