Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu

Katedra Dietetyki
Zakład Żywienia Człowieka
41-808 Zabrze, ul.: Jordana 19, tel./fax: 32 275 51 95
e-mail: zzc@sum.edu.pl

Zabrze, 10.09.2020

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Justyny Wajdy pt.:

„Możliwości wykorzystania nowych biomarkerów ostrego uszkodzenia nerek we wczesnej fazie przebiegu ostrego zapalenia trzustki"

dr hab.n.med. Renata Polaniak

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk medycznych Pani lek. Justyny Wajdy pt.: *„Możliwości wykorzystania nowych biomarkerów ostrego uszkodzenia nerek we wczesnej fazie przebiegu ostrego zapalenia trzustki"* wykonana pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. n.med. Beaty Kuśnierz-Cabaly powstała w oparciu o cykl dwóch oryginalnych publikacji powiązanych ze sobą tematycznie i jednej pracy poglądowej omawiającej możliwość wykorzystania nowych biomarkerów ostrego uszkodzenia nerek we wczesnej fazie przebiegu ostrego zapalenia trzustki, o łącznym współczynniku IF =15,559 (wg. Thomson Reuters Journal Citation Reports '2019) i MNiSW 420:

1. Wajda J., Dumnicka P., Maraj M., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: Potential prognostic markers of acute kidney injury in the early phase of acute pancreatitis. International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20, 3714; doi: 10.3390/ijms20153714, (IF = 4,183; MNiSW = 140);
2. Wajda J., Dumnicka P., Sporek M., Maziarz B., Kolber W., Ząbek-Adamska A., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala, B.: Does beta-trace protein (BTP) outperform cystatin C as a diagnostic marker of acute kidney injury

complicating the early phase of acute pancreatitis? Journal of Clinical Medicine. 2020; 9, 205; doi:10.3390/jcm9010205, (IF = 5,688; MNiSW = 140);

3. Wajda J., Dumnicka P., Kolber W., Sporek M., Maziarz B., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: The marker of tubular injury, kidney injury molecule-1 (KIM-1), in acute kidney injury complicating acute pancreatitis: A preliminary study. Journal of Clinical Medicine. 2020; 9, 1463; doi: 10.3390/jcm9051463, (IF = 5,688; MNiSW = 140).

Wymienione publikacje zostały recenzowane zgodnie z wymogami redakcji *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Journal of Clinical Medicine*. W opinii Recenzenta, wysoka ranga przede wszystkim czasopisma, w którym opublikowane zostały badania własne Doktorantki, świadczą o dużej wartości pracy i jest już wystarczającą rekomendacją przedstawionej mi do recenzji Dysertacji. Na uwagę zasługuje również fakt, że lek. Justyna Wajda we wszystkich publikacjach jest pierwszym Autorem.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska posiada układ zgodny z obowiązującymi dla prac doktorskich. Pracę rozpoczyna „Nota Informacyjna" dotycząca publikacji, które stanowią podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej. Następnie w Rozdziale „Podsumowanie pracy doktorskiej" w poszczególnych podrozdziałach Autorka omawia: „Wstęp", który bardzo dobrze wprowadza czytającego w cykl opublikowanych przez Doktorantkę artykułów. „Cel badania", w którym Doktorantka w sposób jasny i jednoznaczny formułuje trzy cele pracy. Skupiając się przede wszystkim na ocenie wybranych nowych biomarkerów uszkodzenia nerek u chorych we wczesnej fazie OZT pod kątem ich użyteczności w prognozowaniu rozwoju AKI jako powikłania OZT. Markerów nie badanych dotąd u chorych z OZT: białka śladowego beta (BTP) w surowicy i cząsteczki uszkodzenia nerek-1 (KIM-1) w moczu. Dla porównania oceniono także inne markery uszkodzenia nerek (kreatyninę, mocznik, cystatynę C, uromodulinę, lipokalinę związaną z żelatynazą neutrofili – NGAL w surowicy oraz NGAL i wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe – L-FABP w moczu). W „Materiale i metodach" analizowano grupę chorych z OZT pochodzących z dwóch ośrodków: Oddziału Chirurgii Szpitala Powiatowego w Suchej Beskidzkiej i w Oddziału Chirurgii Zespołu Zakładów Opieki Zdrowotnej w Wadowicach. Do badania włączono pacjentów z OZT, rozpoznanym na podstawie zmodyfikowanej klasyfikacji Atlanta z 2012 roku, przyjętych do szpitala w ciągu 24 godzin od wystąpienia objawów. Oznaczenia laboratoryjne, obejmujące badane markery, wykonano w próbkach krwi i moczu pobranych trzykrotnie. AKI rozpoznawano na podstawie wytycznych Kidney Disease: Improving Global Outcomes

(KDIGO) z 2012 roku u 13 chorych. W podrozdziale "Wyniki", J.Wajda przedstawia wyniki badań,zostały opisane w publikacjach, co znacznie ułatwia Recenzentowi ich ocenę. Uzyskane wyniki wskazują na użyteczność oznaczeń BTP, cystatyny C i NGAL w surowicy oraz NGAL w moczu w prognozowaniu AKI jako powikłania OZT we wczesnej fazie choroby. W następnych podrozdziałach Autorka przedstawiła Wykaz i omówienie artykułów, Oświadczenia współautorów, wykaz oraz oryginały publikacji, będących podstawą rozprawy doktorskiej. Ciekawie i klarownie zredagowane streszczenie w języku polskim i angielskim.

Temat rozprawy dotyczy jednego z najbardziej aktualnych zagadnień leczenia ostrego zapalenie trzustki (OZT). Jest ono jednym z najczęstszych ostrych schorzeń jamy brzusznej wymagających hospitalizacji. Różne czynniki etiologiczne, m.in. upośledzenie drożności przewodu trzustkowego spowodowane kamicą żółciową i toksyczny wpływ kwasów żółciowych, alkoholu i jego metabolitów, czy czynniki genetyczne, prowadzą do przedwczesnej aktywacji enzymów trzustkowych i uszkodzenia komórek pęcherzykowych trzustki oraz aktywacji szlaków zapalnych. Taki stan zapalny w ciężkich przypadkach ulega uogólnieniu, doprowadzając do zaburzeń hemodynamicznych i niewydolności narządowej. Klinicznie, ostre zapalenie trzustki daje nasilone początkowe objawy, z dominującym bólem brzucha, który pozostaje jednym z kryteriów diagnostycznych choroby zgodnie z obowiązującą zmodyfikowaną w 2012 r. klasyfikacją Atlanta. Pozostałe kryteria diagnostyczne obejmują zmiany w badaniach laboratoryjnych (co najmniej trzykrotnie podwyższona aktywność enzymów trzustkowych – amylazy lub lipazy – w surowicy) i w badaniach obrazowych jamy brzusznej (tomografii komputerowej z kontrastem, rezonansie magnetycznym lub opcjonalnie w badaniu ultrasonograficznym). Spełnienie dwóch z trzech kryteriów diagnostycznych uprawnia do rozpoznania choroby.

Natomiast, ostre uszkodzenie nerek (acute kidney injury - AKI) jest zróżnicowanym etiologicznie zespołem chorobowym, charakteryzującym się upośledzeniem funkcji filtracyjnej nerek o dynamicznym rozwoju. Zgodnie z obowiązującymi wytycznymi Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), AKI rozpoznaje się w oparciu o wzrost stężenia kreatyniny w surowicy. Wieloletnie badania nad AKI wskazują jednak, że wzrost stężenia kreatyniny może być obserwowany dopiero po 24-36 godzinach od uszkodzenia struktur nerek, a spadek diurezy jest objawem zależnym od etiologii AKI. Wzrost stężenia kreatyniny w surowicy wskazuje na spadek filtracji kłębuszkowej, nie pozwalając na rozróżnienie, nerkowej lub pozanerkowej przednerkowej postaci klinicznej AKI. Z tych względów prowadzone są intensywne badania nad nowymi markerami laboratoryjnymi AKI,

które pozwoliłyby wcześnie rozpoznać uszkodzenie nerek i ocenić rodzaj uszkodzenia, zwiększając szansę na wczesną reakcję i wdrożenie leczenia zapobiegającego nieodwracalnym konsekwencjom AKI.

Wśród nowych markerów laboratoryjnych AKI można wyróżnić markery upośledzonej funkcji filtracyjnej nerek o szybszej dynamice wzrostu w porównaniu do kreatyniny (m.in. cystatyna C i białko śladowe beta – BTP w surowicy), markery uszkodzenia cewki proksymalnej (np. cząsteczka uszkodzenia nerek-1 – KIM-1 i wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe – L-FABP w moczu) i dystalnej (np. lipokalina związana z żelatynazą neutrofili – NGAL w moczu) oraz markery związane z uszkodzeniem zapalnym (np. interleukina 18 i kalprotektyna w moczu)

Zasadne zatem było przez Doktorantkę podjęcie badań, mających na celu sprawdzenie użyteczności diagnostycznej BTP w surowicy w prognozowaniu ciężkości przebiegu OZT we wczesnej fazie rozwoju schorzenia, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości wykorzystania pomiarów jego stężenia w okresie pierwszych 48 godzin trwania OZT, do prognozowania AKI; ocenę znaczenia pomiarów stężenia KIM-1 w moczu w prognozowaniu wczesnego rozwoju AKI, analizę zmian stężeń KIM-1 we wczesnej fazie OZT oraz analizę korelacji pomiędzy stężeniami KIM-1 w moczu a innymi markerami uszkodzenia nerek (L-FABP w moczu, kreatyniną i mocznikiem w surowicy), markerami stanu zapalnego (t.j. CRP, prokalcytonina, rozpuszczalny receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu – uPAR, leukocyty, neutrofile) i sFlt-1 w ciągu pierwszych 72 godzin rozwoju OZT oraz próbę wyłonienia optymalnego panelu diagnostycznego wskaźników umożliwiających wczesne prognozowanie AKI u chorych z OZT we wczesnej fazie rozwoju schorzenia.

Tematykę tę postrzegam jako bardzo oryginalną i nowatorską.

Publikacja *„Potential prognostic markers of acute kidney injury in the early phase of acute pancreatitis"* jest pracą poglądową, która szeroko omawia problematykę OZT obejmując zagadnienia z zakresu epidemiologii, etiologii i diagnozowania OZT, a także powikłania ze szczególnym odniesieniem do AKI. Artykuł stanowi wstęp i uzupełnienie dla pozostałych dwóch prac oryginalnych. Podejmuje próbę prześledzenia ciągów przyczynowo - skutkowych, wyjaśnienia procesów zachodzących w przebiegu OZT i ich wpływu na ciężkość przebiegu choroby i rokowania pacjenta. Szczególną uwagę poświęcono AKI u chorych z OZT, gdyż wystąpienie tego powikłania znacząco pogarsza rokowanie pacjenta. W pracy postawiono nacisk na usystematyzowanie dostępnej wiedzy na temat markerów, które znajdują zastosowanie

w diagnozowaniu AKI na wczesnym etapie choroby oraz tych markerów AKI, które są przydatne w prognozowaniu ciężkości przebiegu OZT. Część z opisywanych markerów nie było dotychczas ocenianych w grupie chorych z OZT, jednak na podstawie dostępnej wiedzy i wyników badań dotyczących chorych hospitalizowanych w oddziałach intensywnej terapii, po zabiegach kardiochirurgicznych, czy w sepsie, można sądzić, że markery te będą potencjalnie użyteczne również w prognozowaniu AKI w przebiegu OZT.

Publikacja "*Does beta-trace protein (BTP) outperform cystatin C as a diagnostic marker of acute kidney injury complicating the early phase of acute pancreatitis?*" stanowi pierwsze doniesienie skupiające się na ocenie użyteczności diagnostycznej BTP jako markera prognostycznego AKI rozwijającego się we wczesnej fazie przebiegu OZT. Grupę badaną stanowiło 73 pacjentów rekrutowanych w dwóch ośrodkach: 46 z Oddziału Chirurgii Szpitala Powiatowego w Suchej Beskidzkiej i 27 z Oddziału Chirurgii Szpitala w Wadowicach. Spośród chorych włączonych do badania, którzy manifestowali objawy OZT do 24 godzin przed przyjęciem do szpitala, 38 chorych rozwinęło łagodną postać OZT (MAP), 28 chorych postać o umiarkowanie ciężkim przebiegu (MSAP), a 7 pacjentów ciężką postać choroby (SAP). Na podstawie kryteriów KDIGO, u 13 pacjentów rozpoznano AKI i ta grupa charakteryzowała się starszym wiekiem w chwili rozpoznania, cięższym przebiegiem choroby, dłuższą hospitalizacją i wyższą śmiertelnością.

U pacjentów z AKI zaobserwowano zmiany w zakresie prowadzonych badań laboratoryjnych: obniżenie wielkości hematokrytu, wzrost stężenia CRP, D-dimerów, angiopoetyny-2, sFlt-1, czy markerów nerkowych: mocznika, kreatyniny, cystatyny C, BTP w surowicy, oraz NGAL w surowicy i w moczu. Istotną statystycznie różnicę uzyskaną podczas pomiaru stężenia BTP u pacjentów z AKI w porównaniu z chorymi, u których to powikłanie nie wystąpiło obserwowano odpowiednio w 1. i 3. dobie, natomiast biorąc pod uwagę uszkodzenie nerek opisywane na podstawie MMSS, zmiany te zaobserwowano w każdym z 3 dni prowadzonego badania.

Stężenie BTP w surowicy, w okresie 3-dniowej obserwacji korelowało dodatnio ze stężeniami mocznika, kreatyniny i cystatyny C, oraz ujemnie z uromoduliną ($p<0,05$). Jednocześnie, nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniami BTP w surowicy a stężeniami NGAL w moczu i surowicy. Użyteczność diagnostyczną BTP w wykrywaniu AKI, wyliczoną na podstawie analizy krzywych ROC (receiver operating characteristic) (wartości pola pod krzywą – AUC w zakresie 0,621 do 0,803) można określić jako umiarkowaną i porównywalną z wartościami

uzyskanymi dla pomiarów cystatyny C. Warto jednak podkreślić, że wartości AUC obliczone dla stężeń NGAL w surowicy i moczu konsekwentnie przewyższały te uzyskane dla BTP.

W pracy nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy stężeniami BTP a markerami stanu zapalnego, podobnie jak nie zaobserwowano znaczących różnic w stężeniach BTP między pacjentami z różną ciężkością przebiegu OZT. Obserwowano jedynie korelacje BTP z wynikiem oceny w skali BISAP i długością hospitalizacji w ostatnim dniu prowadzonych pomiarów. Zaobserwowano też istotną korelację BTP z markerami dysfunkcji śródbłonka: angiopoetyną-2 i sFlt-1. Te markery natomiast korelują z ciężkością przebiegu OZT i wykazują znaczący wzrost u pacjentów z OZT ze współistniejącym AKI.

Publikacja „*The marker of tubular injury, kidney injury molecule-1 (KIM-1), in acute kidney injury complicating acute pancreatitis: A preliminary study*" dotyczy KIM-1, markera uszkodzenia nerek, który był badany w różnych grupach chorych z AKI, także u pacjentów przebywających w OIT, czy po zabiegach kardiochirurgicznych. Jednak do tej pory nie oceniono jego użyteczności diagnostycznej w grupie pacjentów z OZT. Celem niniejszej pracy była analiza przydatności diagnostycznej pomiarów stężenia KIM-1 w moczu w prognozowaniu rozwoju AKI u pacjentów we wczesnej fazie OZT.

Grupę badaną stanowiło 69 chorych z OZT rekrutowanych w Oddziale Chirurgii Szpitala w Wadowicach. Próbki krwi i moczu pobierane były przy przyjęciu i w dwóch kolejnych dobach pobytu w szpitalu. U 21 chorych przebieg OZT oceniono jako MAP, natomiast ciężka postać (SAP) rozwinęła się u 4 pacjentów. Pozostałą grupę 44 osób zaliczono do grupy o umiarkowanie-ciężkim przebiegu (MSAP). AKI rozpoznawane na podstawie kryteriów KDIGO rozwinęło się u 10 pacjentów (mężczyzn). Ta grupa cechowała się większym odsetkiem chorych z MSAP i SAP w stosunku do pacjentów bez AKI (90% do 66%), co wiązało się z częstszą koniecznością leczenia w OIT i wyższą śmiertelnością.

Stężenie KIM-1 w moczu w grupie z AKI nie było istotnie wyższe niż u chorych bez tego powikłania, ponadto KIM-1 nie korelował z wartościami stosowanych powszechnie wskaźników oceniających funkcje nerek: mocznika i kreatyniny. W 2. i 3. dobie badania zaobserwowano natomiast zależność między stężeniami L-FABP i KIM-1 w moczu. Wartości stężeń KIM-1, jak i L-FABP nie różniły się w grupach chorych z MAP oraz MSAP i SAP, ponadto nie korelowały ze skalami BISAP, czy Ransona. U chorych z cięższym przebiegiem OZT zaobserwowano natomiast wyraźną tendencję do wyższych wartości L-FABP. Stężenie

KIM-1 w moczu, w chwili przyjęcia do szpitala znamiennie korelowało z długością hospitalizacji.

W prezentowanym badaniu, pomimo, że nie wykazano związku pomiędzy KIM-1 a ciężkością OZT, czy wystąpieniem AKI, zaobserwowano istotne statystycznie zależności między stężeniem KIM-1 a wybranymi markerami stanu zapalnego oraz niedotlenienia i uszkodzenia komórek, takimi jak CRP, prokalcytonina, uPAR, D-dimery i dehydrogenaza mleczanowa. Dodatkowo, u 58 chorych z powikłaniem w postaci SIRS, stężenie KIM-1 w moczu było wyższe w 2. i 3. dniu trwania OZT.

Na podstawie wyników pracy nie można potwierdzić hipotezy o użyteczności diagnostycznej KIM-1 w prognozowaniu AKI we wczesnej fazie OZT, ani w ocenie ciężkości przebiegu OZT, a jedynie warto podkreślić powiązania z nasileniem stanu zapalnego towarzyszącego OZT. Powyższe obserwacje wymagają potwierdzenia podczas badań na większej grupie chorych.

Podsumowując, uważam, że Doktorantka w przedstawionej mi do recenzji Dysertacji wykazała się wysoką umiejętnością prowadzenia badań naukowych, właściwym doborem metod badawczych oraz umiejętnością wyciągania wniosków z uzyskanych wyników. Podkreślić także należy, że nowatorski charakter badań oraz ich wysoka jakość znalazły również uznanie w oczach Recenzentów czasopism o randze międzynarodowej, w których opublikowano wyniki prezentowanych badań.
Z pełnym przekonaniem uważam, że oceniona rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie lek. Justyny Wajdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto uważam, że dorobek naukowy oraz przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi wkład Doktorantki w zagadnienia związane z poszukiwaniem rozwiązań dotyczących możliwości zwiększenia skuteczność stosowanych terapii, co zostało docenione w pracach opublikowanych w czasopismach o wysokim Impact Factor 'ze.

Dlatego wnoszę ***o wyróżnienie pracy.***

dr hab. Renata Polaniak