Pomorski Uniwersytet Medyczny
Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Prof. dr hab. n. med. Leszek Domański
Al. Powstańców Wielkopolskich 72,
70-111 Szczecin
e-mail: domanle@pum.edu.pl
Tel./fax (91)466-11-96

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kielar zatytułowanej:

„Analiza użyteczności diagnostycznej wybranych markerów białkowych w okresowej laboratoryjnej ocenie pacjentów ze stabilną funkcją nerki przeszczepionej"

Od czasów pierwszego udanego przeszczepienia nerki przez Josepha Murraya minęło blisko 68 lat. Poznawanie i doskonalenie wiedzy w dziedzinie transplantologii przez ponad pół wieku sprawiło, że obecnie przeszczepianie nerek stało się nie tylko jedną z metod leczenia nerkozastępczego, ale zdecydowanie przewyższa inne sposoby leczenia chorych ze skrajną niewydolnością nerek. Jest ona nie tylko „konkurencyjna" wobec innych form leczenia ale znacznie poprawia jakość i przedłuża życie pacjenta. Jednak i z tą metodą wiążą się obciążenia jak konieczność przyjmowania leków immunosupresyjnych, określony styl życia oraz możliwość powikłań wczesnych i późnych.

Odrzucanie przeszczepu jest jedną z najczęstszych przyczyn zmian zapalnych w nerce przeszczepionej i jej utraty. Proces ten może objąć jedną lub kilka struktur przeszczepionego narządu: śródmiąż i cewki, naczynia tętnicze i/lub kłębuszki. Odrzucanie może rozwinąć się w niezmienionym miąższu lub też nałożyć się na inne typy patologii, w tym zmiany obecne w nerce już w chwili przeszczepienia. Istotne wsparcie w procesie diagnostycznym stanowią zarówno ewentualne poprzedzające biopsje przeszczepu, jak i szczegółowe dane kliniczne. Od początku lat 70. ubiegłego wieku biopsja przeszczepu nerkowego pozostaje złotym standardem diagnostyki zaburzeń czynności przeszczepu nerkowego, a także oceny adekwatności immunosupresji.

W zależności od momentu wykonywania biopsji, jakości immunosupresji i immunoreaktywności organizmu biorcy, a także odpowiedzi na dotychczasowe leczenie, obraz morfologiczny procesu odrzucania bywa zróżnicowany. Przebiegające skąpoobjawowo lub bezobjawowo odrzucanie często nie jest wykrywane bądź też rozpoznanie ustalane jest dopiero w fazie, w której w obrazie mikroskopowym dominują wywołane procesem zapalnym: włóknienie zrębu, zanik cewek, arterioskleroza lub przewlekła glomerulopatia przeszczepu.

Pomorski Uniwersytet Medyczny
Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Prof. dr hab. n. med. Leszek Domański
Al. Powstańców Wielkopolskich 72,
70-111 Szczecin
e-mail: domanle@pum.edu.pl
Tel./fax (91)466-11-96

Tradycyjne markery uszkodzenia przeszczepionej nerki (białkomocz, krwiomocz, wałeczkomocz, oliguria lub anuria, zmiana frakcyjnego wydalania z moczem sodu, wzrost wartości parametrów wydalniczej czynności nerek, zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej i kwasowo-zasadowej) również najczęściej nie ulegają ekspresji klinicznej bezpośrednio po zadziałaniu czynnika uszkadzającego. Toczący się więc proces uszkadzający, najczęściej na tle odpowiedzi immunologicznej, może być przyczyną spóźnionej interwencji leczniczej. Toteż wciąż trwają poszukiwania nowych biomarkerów ostrego uszkodzenia nerek już w fazie „przedklinicznej". Wśród najbardziej obiecujących i najlepiej poznanych wskaźników uszkodzenia cewek nerkowych należy wymienić lipokalinę związaną z żelatynazą neutrofilów (NGAL, lipokalina-2, syderokalina). NGAL występuje w osoczu i moczu w formie monomeru, homodimeru i heterodimeru w połączeniu z żelatynazą (metaloproteinazą 9 macierzy zewnątrzkomórkowej – MMP 9). W poszukiwaniu nowych markerów laboratoryjnych, które mogłyby być pomocne w monitorowaniu funkcji nerki przeszczepionej, Doktorantka zwróciła uwagę na inne białko opisane jako receptor dla fragmentu C1q dopełniacza (C1qR1, C1qRp, *cluster of differentiation 93* – CD93). CD93 wykazuje ekspresję na komórkach mieloidalnych i komórkach śródbłonka, i bierze udział w procesach zapalnych. Zewnątrzkomórkowa część CD93 może zostać uwolniona do osocza w wyniku działania metaloproteaz. W nielicznych badaniach odnoszących się do patologii nerek, podwyższone stężenia rozpuszczalnej formy CD93 (*soluble CD93*) w osoczu lub surowicy opisano w związku z cukrzycową chorobą nerek i w zapaleniu naczyń związanym z przeciwciałami przeciw cytoplazmie neutrofili (ANCA).

Niezmiernie cieszy więc fakt, że Doktorantka w swojej dysertacji próbuje wyłonić optymalny panel diagnostyczny wskaźników umożliwiających wczesne prognozowanie uszkodzenia nerki przeszczepionej i zwraca uwagę na potencjalny nowy marker jakim jest sCD93.

Za główny cel swojej pracy mgr. Małgorzata Kielar stawia:

- ocenę użyteczności diagnostycznej NGAL w moczu oraz kompleksu NGAL z metaloproteinazą 9 macierzy pozakomórkowej (MMP 9-NGAL), jako czynników predykcyjnych pogorszenia funkcji nerki przeszczepionej;

Pomorski Uniwersytet Medyczny
Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Prof. dr hab. n. med. Leszek Domański
Al. Powstańców Wielkopolskich 72, *e-mail: domanle@pum.edu.pl*
70-111 Szczecin *Tel./fax (91)466-11-96*

- ocenę stężenia standardowych markerów zapalnych (prokalcytonina i białko C-reaktywne), a także ocenę wybranych markerów zapalnych mogących mieć związek z funkcją nerki przeszczepionej (interleukina 6, składowe C3 i C4 dopełniacza);
- wstępną ocenę użyteczności stężenia C1qR1 (sCD93) w surowicy w ocenie funkcji nerki przeszczepionej.

Do badania włączono pacjentów leczonych w Poradni Chorych po Przeszczepieniu Nerki, pozostającej w strukturach Oddziału Klinicznego Nefrologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Pacjenci byli rekrutowani do badania przez lekarzy specjalistów w dziedzinie nefrologii i transplantologii, w trakcie wizyt kontrolnych w poradni. U każdego z pacjentów przeprowadzono kolejne badanie po upływie co najmniej 12 miesięcy od chwili rekrutacji do badania. Badania prowadzone były zgodnie z protokołem, który posiadał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego nr 1072.6120.46.2019 z dnia 28 lutego 2019 roku. Każdy z uczestników badania został poinformowany o celu badania oraz wyraził pisemnie świadomą zgodę na udział w badaniu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska oparta jest o monotematyczny cykl trzech publikacji, w tym dwóch prac oryginalnych oraz jednej pracy poglądowej, opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie PubMed oraz znajdujących się na liście Journal Citation Reports. Łączna wartość wskaźnika Impact Factor (IF) dla cyklu prac wynosi 14, zaś łączna liczba punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki wynosi 340 (wg Bibliografii UJCM).

Należy podkreślić, że w każdej z prac doktorantka jest pierwszym autorem. W udostępnionej monografii załączono odpowiednie oświadczenia współautorów artykułów, w których wyrażono zgodę na przedłożenie publikacji jako rozprawy doktorskiej w formie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. W oświadczeniach wskazano również na indywidualny wkład w pracę lek. Małgorzaty Kielar, polegający na współudziale w opracowaniu pomysłu i koncepcji pracy, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu i jego edycji oraz przygotowaniu piśmiennictwa.

Pomorski Uniwersytet Medyczny
Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Prof. dr hab. n. med. Leszek Domański
Al. Powstańców Wielkopolskich 72,
70-111 Szczecin
e-mail: domanle@pum.edu.pl
Tel./fax (91)466-11-96

Badania zostały częściowo sfinansowane ze środków Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (grant nr N42/DBS/000171), natomiast publikacje zostały częściowo dofinansowane z rezerwy Dziekana Wydziału Lekarskiego UJCM.

W skład cyklu włączono następujące publikacje:

1. **Kielar M.**, Gala-Błądzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kapusta M., Naumnik B., Kubiak G., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: Complement Components in the Diagnosis and Treatment after Kidney Transplantation – Is There a Missing Link? *Biomolecules* 2021; 11: 773. doi: 10.3390/biom11060773. (IF = 4,879: MNiSW = 100 punktów);

2. **Kielar M.,** Dumnicka P., Gala-Błądzińska A., Bętkowska-Prokop A., Ignacak E., Maziarz B., Ceranowicz P., Kuśnierz-Cabala B.: Urinary NGAL Measured after the First Year Post Kidney Transplantation Predicts Changes in Glomerular Filtration over One-Year Follow-Up. Journal of Clinical Medicine. 2020; 10: 43. doi: 10.3390/jcm10010043. (IF = 4,242, MNiSW =140 punktów);

3. **Kielar M.,** Dumnicka P., Ignacak E., Bętkowska-Prokop A., Gala-Błądzińska A., Maziarz B., Ceranowicz P., Kuśnierz-Cabala B.: Soluble Complement Component 1q Receptor 1 (sCD93) Is Associated with Graft Function in Kidney Transplant Recipients. Biomolecules 2021; 11: 1623. doi: 10.3390/biom11111623. (IF = 4,879: MNiSW = 100 punktów).

Publikacja pierwsza jest pracą poglądową, która szeroko omawia problematykę roli układu dopełniacza w procesach patologicznych toczących się w nerce przeszczepionej, w tym procesach ostrego i przewlekłego odrzucania nerki pezszczepionej. W artykule opisano szczegółowo znaczenie, jakie układ dopełniacza pełni w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym przeszczepu. Prześledzono udział aktywacji dopełniacza w mechanizmach odrzucania przeszczepu zależnego od przeciwciał. Opisano również nowe odkrycia dotyczące roli fragmentów C3 i C5 dopełniacza w aktywacji limfocytów

Pomorski Uniwersytet Medyczny
Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Prof. dr hab. n. med. Leszek Domański
Al. Powstańców Wielkopolskich 72, *e-mail: domanle@pum.edu.pl*
70-111 Szczecin *Tel./fax (91)466-11-96*

T i udział układu dopełniacza w odrzucaniu typu komórkowego. Poruszono problem mikroangiopatii zakrzepowej, nawrotu nefropatii w nerce przeszczepionej, nefrotoksyczności inhibitorów kalcyneuryny. Praca ta stanowi znakomity wstęp i wprowadzenie w arkana tematyki ujętej w pozostałych dwóch pracach oryginalnych.

W publikacji drugiej Doktorantka poddaje ocenie użyteczność diagnostyczną stężenia NGAL i kompleksu MMP 9-NGAL w moczu u pacjentów z funkcjonującą nerką przeszczepioną. Głównym celem pracy była ocena stężenia NGAL w moczu jako wskaźnika umożliwiającego wczesne wychwycenie uszkodzenia nerki przeszczepionej. Badaniem objęto 109 dorosłych pacjentów rekrutowanych przynajmniej rok po przeszczepieniu w trakcie rutynowych kontrolnych wizyt ambulatoryjnych. Po około 12-miesięcznej obserwacji wykazano 10% lub większy spadek eGFR u 30 pacjentów (28%). Pogorszenie funkcji filtracyjnej było dodatnio skorelowane z wyjściową albuminurią. Doktorantka wykazała, że stężenie NGAL w moczu mierzone na początku badania było dwukrotnie wyższe u pacjentów, którzy wykazali 10% lub większy spadek eGFR po roku obserwacji. Autorka wskazuje, iż początkowe stężenie NGAL można potraktować jako dodatkowy wskaźnik predykcyjny, umożliwiający wczesne wychwycenie spadku eGFR, niezależny od wyjściowej wartości eGFR i albuminurii. Dodatkowo w podgrupie 77 pacjentów oceniła stężenie kompleksu MMP 9-NGAL w moczu i wykazała, że u pacjentów u których w trakcie dalszej rocznej obserwacji rozwinęło się zakażenie dróg moczowych stwierdzono wyższe wyjściowe stężenia NGAL i MMP 9-NGAL w moczu. Doktorantka nie wykazała jednak związku MMP 9-NGAL z pogorszeniem funkcji nerki przeszczepionej.

W publikacji trzeciej Doktorantka podsumowuje ocenę możliwości wykorzystania stężeń markerów zapalnych w surowicy chorych z funkcjonującym przeszczepem nerki jako dodatkowych badań kontrolnych. Ocenia znane wskaźniki zapalne: CRP, prokalcytoninę, interleukinę 6 oraz składniki C3 i C4 dopełniacza. Dodatkowo mierzy stężenie sCD93 w surowicy, które do tej pory, co należy podkreślić, nie było badane u pacjentów po przeszczepieniu nerki.

Pomorski Uniwersytet Medyczny
Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Prof. dr hab. n. med. Leszek Domański
Al. Powstańców Wielkopolskich 72,
70-111 Szczecin
e-mail: domanle@pum.edu.pl
Tel./fax (91)466-11-96

Badaniem objęto 78 pacjentów ze stabilną funkcją nerki przeszczepionej. Z istotnych obserwacji wynikających z badania należy podkreślić dodatnią korelację między stężeniem sCD93 w surowicy pacjentów a stężeniem kreatyniny w surowicy, ujemną korelację z eGFR oraz dodatnią korelację z nasileniem albuminurii. Ponadto, wyjściowe stężenie sCD93 ujemnie korelowało z końcową wartością eGFR po roku obserwacji pacjentów. Doktorantka nie zaobserwowała natomiast korelacji pomiędzy sCD93 a znanymi markerami stanu zapalnego (CRP, interleukina 6, prokalcytonina) i składowymi dopełniacza C3 i C4. Stwierdziła, że stężenie sCD93 było istotnie związane z klinicznie istotnym pogorszeniem funkcji przeszczepu w trakcie rocznej obserwacji oraz występującym białkomoczem. Przeprowadzone badanie w chwili publikacji było pierwszym doniesieniem wskazujących na związek sCD93 z funkcją nerki u pacjentów po przeszczepieniu tego organu.

Doktorantka podkreśla, iż przedstawione wyniki wskazują na potencjalnie znaczącą przydatność diagnostyczną pomiarów stężeń badanych parametrów: stężenia NGAL w moczu, kompleksu NGAL z żelatynazą neutrofili (MMP 9-NGAL) oraz stężenia sCD93 w surowicy w ocenie funkcji nerki przeszczepionej. Mimo ograniczeń dotyczących liczebności przebadanych dotychczas grup chorych (w szczególności w pracy nr 3), Doktorantka sugeruje się, aby spojrzeć na zaproponowane parametry w kategoriach potencjalnie nowych narzędzi diagnostycznych, o które warto poszerzyć podstawowy panel badań monitorujących pacjentów w ocenie stabilności funkcji nerki po transplantacji. Ze względu na dostępność w pełni zautomatyzowanej platformy analitycznej do oznaczeń NGAL w moczu i jego potwierdzoną rolę jako czynnika predykcyjnego pogorszenia funkcji nerki przeszczepionej, taka strategia diagnostyczna mogłaby przyczynić się do wykrycia wczesnych zmian i uszkodzeń przeszczepionego organu. Jest to niewątpliwie istotna przesłanka w nieinwazyjnej kontroli funkcji nerki przeszczepionej. Doktorantka zwraca również uwagę na ograniczenia jakie mogą wynikać z dostępności do oznaczeń sCD93 w surowicy oraz kompleksu MMP 9-NGAL w moczu. Aktualnie, oba parametry można oznaczać jedynie z wykorzystaniem techniki ELISA i brak jest w pełni

Pomorski Uniwersytet Medyczny
Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Prof. dr hab. n. med. Leszek Domański
Al. Powstańców Wielkopolskich 72, *e-mail: domanle@pum.edu.pl*
70-111 Szczecin *Tel./fax (91)466-11-96*

zautomatyzowanych zestawów do ich pomiaru, co w oczywisty sposób wpływa na możliwość wykorzystania tych badań w codziennej praktyce klinicznej.

Podsumowując uważam rozprawę za dokonanie bardzo wartościowe i pragnę podkreślić istotne walory poznawcze wykonanych badań. Tak przedstawiona praca doktorska budzi nie tylko uznanie recenzenta, ale jej recenzja jest też ogromną przyjemnością. Dysertacja w formie publikacji świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i niewątpliwie jest również zasługa Promotora i Promotora pomocniczego.

Publikacja wyników badań w czasopismach indeksowanych o wysokim sumarycznym IF za prace będące składowymi dysertacji z urzędu wskazuje, **że praca doktorska ta jest wysokiej miary i zasługuje na wyróżnienie suma cum laude o co wnoszę do Rady Dyscypliny nauk Medycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego.**

Prof. dr hab. n. med. Leszek Domański