Kraków, 01.06.2022 r.

Dr hab. n.med. Monika Miklaszewska
Klinika Nefrologii Dziecięcej i Nadciśnienia Tętniczego
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim
15-089 Białystok, ul. Jana Kilińskiego 1

Senat Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Joanny Bagińskiej na temat: „Ocena markerów wczesnego uszkodzenia nerek i stanu odżywienia u dzieci z pęcherzem neurogennym"

Cykl prac będącym doktorskim osiągnięciem naukowym Doktorantki lek. Jolanty Bagińskiej poświęcony jest tematyce neurogennych zaburzeń pęcherza moczowego u dzieci z przepukliną oponowo – rdzeniową. Składa się on z 2 prac oryginalnych 1/ Joanna Bagińska, Alicja Liszewska, Anna Wasilewska, Agata Korzeniecka-Kozerska.: The role of appetite-regulating hormones: Ghrelin and leptin in the nutritional status of children with neurogenic bladder due to myelomeningocele. Journal of Paediatrics and Child Health, 2019, 55, 928–931; 2/ Joanna Bagińska, Agata Korzeniecka-Kozerska: Are Tubular Injury Markers NGAL and KIM-1 Useful in Pediatric Neurogenic Bladder? J. Clin. Med. 2021, 10, 2353 oraz 1 pracy poglądowej: Joanna Bagińska, Agata Korzeniecka-Kozerska: Non-invasive markers in the management of pediatric neurogenic bladder over the last two decades – A review. Advances in Medical Sciences, 2021, 66, 162–169.

Przepuklina oponowo – rdzeniowa (myelomeningocele - MMC) jest skutkiem zaburzenia prawidłowego procesu zamykania cewy nerwowej we wczesnym okresie życia zarodkowego. Epidemiologia przepukliny oponowo – rdzeniowej w populacji to zakres od 0.3 do 4.5/1000 urodzeń. Współcześnie w większości krajów europejskich znaczny odsetek ciąż z prenatalnym potwierdzeniem tej wady jest terminowany – natomiast w naszym kraju jest to odczuwalna proporcja pacjentów, która pojawia się między innymi w poradniach i oddziałach nefrologii dziecięcej.

Konsekwencją MMC są niedowłady i/lub porażenia, wady układu kostnego, zaniki mięśniowe, zaburzenia ze strony dolnego odcinka przewodu pokarmowego oraz pęcherz neurogenny (neurogenic bladder - NB), który może doprowadzić w różnych mechanizmach do uszkodzenia górnych dróg moczowych w tym do schyłkowej niewydolności nerek, która jest raportowana nawet u 30-40% dorosłych osób z MMC.

Uwzględniając fakt, że znamienna większość dzieci z MMC rodzi się z prawidłowymi nerkami – oznacza to, że do ich uszkodzenia dochodzi w trakcie rozwoju osobniczego na skutek zaburzonej dynamiki pracy dolnych dróg moczowych (w tym wysokiego stopnia odpływów pęcherzowo-moczowodowych i spastycznego zwieracza) oraz gorączkowych zakażeń układu moczowego (ZUM).

Kolejnym ważnym polem jest ocena stanu odżywienia dzieci z MMC, które z uwagi na szereg współchorobowości oraz ograniczeń wynikających z choroby podstawowej z jednej strony są narażone na otyłość (na skutek zaburzeń neurologicznych i ograniczeń w aktywności fizycznej) a z drugiej - na niedożywienie białkowe będące skutkiem katabolizmu w wyniku między innymi przewlekłych procesów zapalnych (w tym nawracających ZUM czy też odleżyn) oraz prowadzonego leczenia zachowawczego i operacyjnego (w tym obciążających zabiegów ortopedycznych).

Doktorantka w 2 pracach oryginalnych postawiła sobie 3 cele: 1/ocena przydatności cząsteczek: kidney injury molecule-1 (KIM1) i neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) jako markerów wczesnego uszkodzenia nerek u dzieci z pęcherzem neurogennym; 2/określenie roli hormonów regulujących apetyt: greliny i leptyny w ocenie stanu odżywienia pacjentów z pęcherzem neurogennym oraz 3/ocena zależności cząsteczek KIM1 i NGAL, leptyny i greliny w odniesieniu do aktywności fizycznej dzieci z NB.

Praca oryginalna Joanna Bagińska, Alicja Liszewska, Anna Wasilewska and Agata Korzeniecka-Kozerska: The role of appetite-regulating hormones: Ghrelin and leptin in the nutritional status of children with neurogenic bladder due to myelomeningocele. Journal of Paediatrics and Child Health, 2019, 55, 928–931 – poświęcona jest zaburzeniom hormonalnym wpływającym na stan odżywienia dzieci z MMC. Celem pracy była ocena stężenia w surowicy dwóch hormonów (leptyny i greliny) oraz ich korelacji ze stanem odżywienia i aktywnością fizyczną dzieci z NB w porównaniu greliny do dzieci zdrowych.

W omawianej pracy, w której analizą objęto 67 dzieci z MMC i 20 dzieci zdrowych - Doktorantka między innymi wykazała, że mediana stężenia leptyny w grupie dzieci z NB wynosiła 4.47 ng/ml (zakres: 0.46-52.8) vs 2.06 ng/ml (zakres:0.78 -10.13) w grupie dzieci zdrowych oraz, że mediana greliny w grupie dzieci z NB wynosiła 109.41 pg/ml (zakres:12.85-693.5) vs 67.16 pg/ml (zakres:0.87-155.37) w grupie dzieci zdrowych. Obydwie różnice osiągnęły znamienność statystyczną.

Ponadto, w artykule wykazano negatywne znamienne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem

leptyny a stopniem samodzielności ruchowej (najwyższe stężenia odnotowano w grupie dzieci poruszających się na wózku; r = −0.323) oraz poziomem przepukliny oponowo – rdzeniowej (najwyższe stężenia odnotowano w grupie dzieci o poziomie piersiowym MMC; r = −0.299). Niestety, w pracy nie podano liczby dzieci z poszczególnymi poziomami MMC, co dość znamiennie ogranicza charakterystykę ocenianej grupy.

Zgodnie z tym co pisze Doktorantka w swojej pracy - omawiane hormony wykazują poza głównymi swoimi działaniami szereg innych efektów plejotropowych w tym między innymi wpływają na stan zapalny w ustroju. Leptyna jest białkiem z jednej strony o własnościach pro-zapalnych, ale z drugiej strony jej stężenie (i działanie) jest zależne od stanu zapalnego. Jak wiadomo dzieci z MMC są stale narażone na stan zapalny i związany z tym katabolizm. Nawet uwzględniając fakt, że z pracy zostały wyeliminowane dzieci, które przebyły ZUM w okresie ostatnich 3 miesięcy to jednak nadal nie można bez uwzględnienia innych czynników wpływających na stężenia badanych hormonów - porównywać tych dzieci z dziećmi zdrowymi. W związku z tym, w pracy brakuje analizy wpływu na ostateczne wartości badanych hormonów między innymi parametrów stanu zapalnego (przykładowo: wysoce czułego białka C reaktywnego, prokalcytoniny czy też interleukiny 6), brak jest także informacji na temat wielkości odpływów pęcherzowo – moczowodowych (OPM) u dzieci w grupie z NB, na temat faktu i częstości czystego przerywanego cewnikowania (CIC), leków przyjmowanych przez pacjentów – a te wszystkie parametry (w połączeniu z upośledzoną funkcją nerek) mogą wpływać na nasilenie stanu zapalnego ustroju wpływając tym samym na uzyskane ostateczne wartości badanych hormonów. Dlatego też sformułowane przez Doktorantkę pierwsze dwa wnioski z pracy w brzmieniu: „podwyższone stężenia leptyny i greliny mogą być czynnikami wpływającymi na stan odżywienia dzieci z NB z uwagi na MMC" oraz „dzieci z NB mogą mieć zaburzoną regulację endokrynną hormonów wpływających na homeostazę energetyczną" nie są wyczerpujące, gdyż praca poza stwierdzeniem bezspornego faktu wyższych stężeń greliny i leptyny u dzieci z NB w porównaniu do dzieci zdrowych – w zasadzie nie tłumaczy tego zjawiska ze statystycznym uzasadnieniem tego faktu. Stężenie leptyny jest ściśle skorelowane z tłuszczową masa ciała z uwagi na fakt, że jest ona wydzielana głównie przez tkankę tłuszczową. Zatem jeden z wniosków z pracy mówiący, że lepsza aktywność fizyczna jest czynnikiem wpływającym na stężenie leptyny - jest wnioskiem jedynie częściowym, gdyż w pracy brakuje przykładowo analizy regresji wieloczynnikowej, która wykazałaby co rzeczywiście wpływa na stężenia badanych markerów w populacji dzieci z NB (w tym bardzo pomocna byłaby tutaj między innymi ocena tłuszczowej i beztłuszczowej masy ciała, analiza/korelacja wartości (pre)albuminy; transferryny, lipidogramu i innych markerów stanu odżywienia.

Niemniej jednak praca jako rzeczywiście pionierska w temacie wskaźników stanu odżywienia u dzieci z MMC - stanowi ważne podwaliny do dalszego zgłębiania tematu i bardziej szczegółowych badań mających na celu znalezienie odpowiedzi na pytanie jakie czynniki fizyczne, farmakologiczne,

neuroendokrynne czy też biochemiczne - wpływają na stan odżywienia dzieci z poszczególnymi poziomami MMC.

Praca oryginalna Joanna Bagińska, Agata Korzeniecka-Kozerska: Are Tubular Injury Markers NGAL and KIM-1 Useful in Pediatric Neurogenic Bladder? J. Clin. Med. 2021, 10, 2353 – poświęcona jest próbie oceny przydatności ww. markerów u dzieci z NB. Niestety, w tekście artykułu brakuje czytelnie doprecyzowanego celu badania, który by uściślił jakie kwestie konkretnie są poddawane analizie.

W swojej pracy, w której analizą objęto 58 dzieci z MMC i 25 dzieci zdrowych Doktorantka między innymi wykazała, że mediana stężenia uNGAL(ng/ml) i stosunku uNGAL/uKreatyniny (uNGAL/uCr) (ng/mg) w grupie dzieci z MMC wynosiła odpowiednio 10.3 i 27.1 vs 1.32 i 0.98 w grupie dzieci zdrowych.
Ponadto wykazano, że stosunek uNGAL/uCr był wyższy w subpopulacji dziewczynek w obu badanych grupach, co potwierdza doniesienia piśmiennictwa, że stężenie tej cząsteczki jest wyższe u płci żeńskiej.

Badana populacja dzieci z MMC - z uwagi na fakt, że aż 65% dzieci nigdy nie miało ZUM a 72% dzieci nigdy nie miało OPM - jest dość szczególna i może zaburzać ostateczne wnioski wynikające z pracy. Zrozumiały jest bowiem wynik znamiennej różnicy statystycznej w zakresie uNGAL/uCr pomiędzy dziećmi z nZUM w wywiadzie (45.13 mg/mg) vs dzieci bez nZUM (19.05 ng/mg), natomiast wniosek dotyczący braku różnic w zakresie stężenia tej cząsteczki u dzieci z i bez OPM może być zaburzony faktem małej liczby dzieci z tą współchorobowością i brakiem podziału subpopulacji dzieci z OPM na OPM niskie (I-III) i wysokie (IV-V).

Doktorantka w jednym z wniosków porusza wpływ grubości oraz podatności ściany pęcherza moczowego jako czynników mogących mieć wpływ na stężenie uNGAL. Jednak znamienna statystycznie korelacja pomiędzy parametrem uNGAL/uCr a grubością ściany pęcherza moczowego (= 0.57) jest w pracy przedstawiona w sposób niepełny – gdyż nie określono w jakich warunkach oceniano grubość ściany pęcherza moczowego (czy był to pusty pęcherz?; wypełniony do określonej objętości?; czy pomiar miał miejsce przy określonym ciśnieniu w pęcherzu moczowym podczas urodynamiki? w jakiej projekcji mierzono grubość ściany pęcherza, grubość której ściany mierzono?); Ujemna korelacja (r=-0.52) pomiędzy podatnością ściany pęcherza moczowego a wartością uNGAL/uCr jest znamienna statystycznie i spójna z biologią analizowanego markera.

W artykule wykazano, że u dzieci z grupy, która poruszała się samodzielnie - stężenia uNGAL i uNGAL/uCr były znamiennie statystycznie niższe vs pozostałe grupy dzieci, których stopień ruchowej samodzielności był gorszy. Ponadto nawiązując do pierwszego wniosku omawianej pracy (podwyższone stężenia uNGAL mogą być biomarkerem cewkowego uszkodzenia u dzieci z NB w przeciwieństwie do KIM1) - należy pamiętać, że uNGAL jest nie tylko markerem uszkodzenia cewek

nerkowych, ale także markerem stanu zapalnego, który z różnych przyczyn jest bardziej nasilony w grupie dzieci z MMC w porównaniu do dzieci zdrowych i zapewne jest bardziej nasilony w subgrupie dzieci z MMC z gorszą sprawnością ruchową vs subgrupa dzieci z MMC z lepszą sprawnością ruchową. Dodatkowo, należy pamiętać, że stężenie uNGAL oznaczanego w moczu jest wypadkową stężenia cząsteczki przesączonej przez kłębuszek nerkowy a uszkodzeniem cewek, które w warunkach fizjologii niemal w całości reabsorbują tą cząsteczkę natomiast w warunkach uszkodzenia de-novo ją syntetyzują. Obecność uNGAL w moczu może świadczyć zatem zarówno o uszkodzeniu cewek (o syntezie przez nie markera de-novo), ale dodatkowo trzeba pamiętać, że na wynik ostatecznego stężenia ma wpływ wielkość przesączonego ładunku markera z krwi, w której jest między innymi markerem stanu zapalnego. Prawidłowa wartość CRP – jest zbyt ogólnym parametrem i nie jest w stanie wykluczyć subkliniczego / ograniczonego stanu zapalnego. W związku z tym wydaje się, że w pracy brakuje korelacji uNGAL i KIM1 z określonymi (czulszymi) parametrami stanu zapalnego, które mogą modyfikować ostateczne stężenia badanych markerów.

Nawiązując do kolejnego wniosku w omawianej pracy należy zaznaczyć, że mała wiarygodność stężenia kreatyniny do oceny funkcji nerek i wyliczania na jej podstawie wartość eGFR u dzieci z MMC i zanikami mięśniowymi jest kwestią znaną i podnoszoną w piśmiennictwie już od wieku lat. W zaleceniach Polskiego Towarzystwa Urologii Dziecięcej dotyczących postępowania u dzieci z neurogenną dysfunkcją dolnych dróg moczowych z 2021 roku - wymieniono Cystatynę C jako marker, który powinien być oznaczany do oceny funkcji nerek obok kreatyniny.

Niemniej jednak praca w której przeanalizowano liczne parametry kliniczne, laboratoryjne, elementy badań obrazowych (ultrasonografia, cystografia mikcyjna) i czynnościowych (renoscyntygrafia i urodynamika) układu moczowego - stanowi ważny wkład do wiedzy na temat czynników uszkadzających nerki u dzieci z MMC i być może będzie stanowić element pomocny do ustalenia punktów odcięcia dla NGAL w ocenie ryzyka uszkodzenia cewek nerkowych.

Praca poglądowa Joanna Bagińska, Agata Korzeniecka-Kozerska: Non-invasive markers in the management of pediatric neurogenic bladder over the last two decades – A review. Advances in Medical Sciences, 2021, 66, 162–169 – poświęcona jest przeglądowi piśmiennictwa dotyczącego oceny przydatności cząsteczek KIM1 i NGAL jako markerów wczesnego uszkodzenia nerek u dzieci z pęcherzem neurogennym od początku XXI wieku. W pracy zwraca uwagę profesjonalnie zaplanowany przegląd piśmiennictwa stanowiącego bazę przygotowania artykułu. Do finalnej analizy zakwalifikowano 28 artykułów. W artykule poruszono tematykę przydatności określonych nieinwazyjnych markerów w obszarach takich jak: ZUM, zaburzenia czynnościowe pęcherza moczowego oraz funkcja nerek u dzieci z MMC. Praca stanowi doskonałe podsumowanie aktualnej wiedzy na ten temat.

Podsumowując pomimo powyższych uwag do artykułów stanowiących osiągniecie naukowe - omówione prace wnoszą nowe informacje w zakres wiedzy na temat postępowania z dziećmi z pęcherzem neurogennym i stanowią solidną bazę do dalszych badań nad poruszonym przez Doktorantkę tematem. Wydaje się, że dalszym kierunkiem powinno być między innymi określenie punktów odcięcia uNGAL i/lub uNGAL/uCr w szacowaniu ryzyka bliznowacenia nerek i postępu PChN w populacji dzieci z MMC. Natomiast w przypadku analizy markerów stanu odżywienia - w oparciu o uzyskane wyniki można by poszukać odpowiedzi na pytanie jakie czynniki u dzieci z MMC są odpowiedzialne za podwyższone stężenia greliny i leptyny w tej populacji pacjentów.

Dorobek naukowy Doktorantki jest znaczący i wypełniający wymagania na stopień doktora w naukach medyczych: cykl 3 omówionych powyżej prac stanowiących osiągnięcie doktorskie – został opublikowany w czasopismach o łącznej punktacji 9.239 punktów impact factor (340 punktów MNiSW); natomiast całokształt dorobku Doktorantki to 10 prac naukowych o łącznej punktacji 16.073 punktów IF (729 punktów MNiSW).

Z powyższych względów, przedkładam wniosek Radzie ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauk medycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Joanny Bagińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.