Katedra i Klinika Nefrologii
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum w Krakowie

13.08.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Lek. med. Angeliki Biełach-Bazyluk zatytułowanej: **„Znaczenie sirtuiny 1 i α-klotho jako biomarkerów przewlekłej choroby nerek oraz jej powikłań".**
Przewód doktorski prowadzony jest **w dziedzinie nauk medycznych.**

Białka Sir (*Silent information regulator),* znane powszechniej jako sirtuiny, to grupa białek enzymatycznych należących do grupy deacetylaz histonowych (HDAC), zlokalizowanych w jądrze komórkowym, mitochondrium oraz cytoplazmie. Najbardziej poznanym z nich jest białko SIRT1. Pierwszą sirtuinę wyizolowano w 1984 r. z drożdży i nazwano Sir2. Sirtuinom przypisuje się szeroką rolę w funkcjonowaniu organizmu na poziomie komórki pod postacią posttranslacyjnej modyfikacji białek, wyciszania transkrypcji genów, uruchamiania systemów naprawczych, regulacji procesów metabolicznych – apoptozy, gospodarki węglowodanowo-lipidowej. SIRT 1 wpływa na zmniejszenie insulinooporności. Sirtuiny mają wykazany wpływ na intensywność procesu starzenia się. Białka te poprzez czynniki transkrypcyjne z rodziny FOXO nasilają procesy naprawcze DNA, odgrywają funkcję antyoksydacyjną oraz zwiększają odporność na stres. Kolejnym celem działania SIRT1 jest białko p53. Poprzez jego inaktywację sirtuina oddziałuje na apoptozę komórek a także powstawanie tzw. komórek nieśmiertelnych. Dzięki wpływowi na białko p53 a także deacetylacji czynnika FOXO, SIRT1 może zapobiegać procesom degeneracyjnym. W zakresie nerek udowodniono wpływ SIRT 1 na funkcję podocytów w błonie filtracyjnej poprzez wpływ na regulację ekspresji klaudyny 1.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zatytułowana: „**„Znaczenie sirtuiny 1 i α-klotho jako biomarkerów przewlekłej choroby nerek oraz jej powikłań"** obejmuje: 12 rozdziałów, w tym wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, zestawienie publikacji

doktoranta z uwzględnieniem indeksacji w zakresie współczynnika oddziaływania – Impact Factor i punktacji MNiSW, wprowadzenie, cele pracy, omówienie metodyki, analizy statystycznej oraz wyników badań zawartych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy oraz wnioski. Zbiór dokumentów zawiera także dwie ryciny, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz cytowanego piśmiennictwa, publikacje stanowiące rozprawę doktorską, ksero Zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzone badania oraz wzór zgody pacjenta. Dodatkowo zostały dołączone oświadczenia Kandydatki i współautorów publikacji o wiodącej roli Doktorantki we współtworzeniu koncepcji, zebraniu materiału do badań, przygotowaniu piśmiennictwa, interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu i przygotowaniu do publikacji.

Kolejno we wstępie, Kandydatka w sposób zwięzły aczkolwiek wyczerpujący omawia definicję, epidemiologię przewlekłej choroby nerek (PChN) oraz użyteczne wskaźniki służące do diagnostyki oraz klasyfikacji PChN w postaci szacowania filtracji kłębuszkowej na podstawie stężenia kreatyniny we krwi oraz pomiaru albuminurii. Omawia także rolę oznaczenia stężenia cystatyny C szczególnie w przypadkach wymagających weryfikacji. Kandydatka opisała również zależność pomiędzy funkcją nerek a układem sercowo-naczyniowym ze szczególnym uwzględnieniem roli zaburzeń gospodarki mineralno-kostnej. Omówiła także znaczenie niedokrwistości, przewlekłego, subklinicznego stanu zapalnego, niedożywienia na dysfunkcję skurczową serca. Z uwagi na wysokie ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych w grupie chorych z PChN poszukiwanie strategii mających na celu określenie wczesnych markerów tej choroby wydaje się ze wszech miar słuszne. Oznaczenie wczesnych wskaźników uszkodzenia nerek mogłoby przyczynić się do spowolnienia utraty funkcji nerek poprzez identyfikację czynników ryzyka i wprowadzenie optymalnej metody leczenia co w konsekwencji pozwoliłoby na zmniejszenie ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w tej populacji pacjentów.

Cele pracy zostały sformułowane jasno i czytelnie: obejmowały ocenę stężenia sirtuiny 1 i α-klotho w surowicy pacjentów z PChN leczonych zachowawczo oraz ustalenie zależności pomiędzy badanymi białkami a stopniem zaawansowania choroby, ocenianym na podstawie wielkości przesączania kłębuszkowego wyliczanego w oparciu o stężenie kreatyniny i cystatyny C. Ponadto celem pracy była analiza wzajemnych relacji pomiędzy sirtuiną 1, α-klotho i innymi parametrami funkcji nerek oraz określenie zależności pomiędzy badanymi

białkami a wybranymi parametrami laboratoryjnymi, współistnieniem chorób sercowo-naczyniowych, czynnikami demograficznymi a także stosowanym leczeniem.

Do badania zostało włączonych 100 dorosłych pacjentów z przewlekłą chorobą nerek, hospitalizowanych w latach 2017-2019 w II Klinice Nefrologii z Oddziałem Leczenia Nadciśnienia Tętniczego i Pododdziałem Dializoterapii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku oraz grupę kontrolną 24 zdrowych ochotników, dobranych pod względem wieku i płci. Z badania wykluczono pacjentów z ostrym uszkodzeniem nerek, zaostrzeniem PChN, leczonych terapią nerkozastępczą (tj. hemodializy, dializy otrzewnowe, stan po przeszczepieniu nerki). Wszyscy pacjenci wyrazili świadomą, pisemną zgodę na badanie. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr zgody: R-I-002/455/2016) oraz przeprowadzone zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej. Dane kliniczne zebrano na podstawie analizy dokumentacji medycznej, badania przedmiotowego oraz wyników badań laboratoryjnych, przeprowadzonych standardowymi metodami w laboratorium szpitalnym, dostępnych w systemie komputerowym CliniNet. Analizie poddano wiek i płeć pacjentów, wskaźnik masy ciała BMI (BMI – body mass index), stopień zaawansowania oraz etiologię PChN, średnie ciśnienie tętnicze, leczenie hipotensyjne oraz status stosowania metforminy i leków z grupy statyn, wywiad osobniczy w kierunku chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy oraz hiperlipidemii. Wśród badań laboratoryjnych uwzględniono: morfologię krwi, gospodarkę wapniowo-fosforanową, glikemię, profil lipidowy, badanie ogólne moczu.

Na analizowaną rozprawę doktorską składają się dwie publikacje, w tym jedna o charakterze poglądowym oraz jedna oryginalnym o autorstwie zbiorowym. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Artykuł oryginalny opublikowany został w renomowanym czasopiśmie o IF- 3,023, MNSiW- 100 pkt, natomiast praca poglądowa została przyjęta do druku w *Advances in Medical Sciences* o współczynniku oddziaływania IF- 2,57 i punktacji MNiSW- 100 pkt. Sumaryczny IF cyklu prac włączonych do rozprawy wynosi 5,593 i punktacji MNiSW- 200 punktów. **We wszystkich artykułach Kandydatka potwierdziła znaczący udział własny w przygotowywaniu każdej publikacji składających się na osiągnięcie naukowe.**

Ponadto Kandydatka była współautorką 5 prac o łącznym IF- 12,929 , MNiSW- 480 punktów oraz 3 streszczeń przedstawionych na konferencjach naukowych. Sumaryczny dorobek Kandydatki 7 opublikowanych artykułów wynosi IF- 18,522, MNiSW- 680 punktów.

W pracy poglądowej *„State of the art - sirtuin 1 in kidney pathology - clinical relevance"*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej, opublikowanej w 2019 r. w czasopiśmie *Advances in Medical Sciences*, Kandydatka w sposób szczegółowo omówiła związek sirtuiny 1 z chorobami nerek. Podkreśliła znaczenie nefroprotekcyjne SIRT1 w tłumieniu reakcji zapalnej przez wpływ na ekspresję czynnika jądrowego NF-κB, wpływ na angiogenezę – zmniejszenie ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGF-A, hamowanie włóknienia zależnego od transformującego czynnika wzrostu TGFβ1, układ RAA – zmniejszenie ekspresji receptora AT1R oraz zwiększenie stężenia angiotensyny 1-7, regulację ciśnienia tętniczego – zahamowanie resorpcji zwrotnej sodu w cewkach nerkowych (kanał EnaC), regulacja osi RAA, indukcja śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS), zachowanie funkcji podocytów w błonie filtracyjnej – regulacja ekspresji klaudyny 1 – białka wchodzącego w skład połączeń ścisłych. Ponadto Autorka omówiła rolę SIRT1 w ostrym uszkodzeniu nerek, stymulacji SIRT1 w hamowaniu włóknienia śródmiąższowego u chorych po transplantacji nerek, w karcynogenezie raka jasnokomórkowego nerki, w hamowaniu progresji wielotorbielowatości nerek w modelach zwierzęcych a także rolę SIRT1 jako biomarkera chorób z autoagresji, tocznia układowego.

Kolejna publikacja dotyczy już badań własnych. Kandydatka poddała szczegółowej analizie statystycznej (używając programu komputerowego Statistica 13.3 firmy StatSoft) wyniki badań, które zostały opublikowane po uzyskaniu pozytywnych recenzentów. W publikacji pt. *„Serum sirtuin 1 is independently associated with intact PTH among patients with chronic kidney disease."* opublikowanej w czasopiśmie *Clinical Interventions in Aging* o współczynniku oddziaływania - IF- 3,023, MNSiW- 100 pkt. Doktorantka wykazała istotną zależność SIRT1 ze stopniem zaawansowania uszkodzenia nerek już w bardzo wczesnym etapie PChN, w stadium G1 i G2. Ponadto Autorka wykazała istotne korelacje pomiędzy stężeniem sirtuiny 1 i konwencjonalnymi biomarkerami PChN oraz filtracją kłębuszkową szacowaną na ich podstawie, z najsilniejszą zależnością od eGFR wyliczanego w oparciu o stężenie cystatyny C i wzór CKD-EPI. Doktorantka w swoich badaniach stwierdziła istotną korelację pomiędzy stężeniem sirtuiny 1 w surowicy oraz stężeniem iPTH i wiekiem. Kandydatka wykazała istotnie statystycznie niższe stężenie sirtuiny 1 wśród pacjentów przyjmujących statyny, antagonistów receptora AT1 i β-blokery. Brak natomiast było zależności sirtuiny 1 od stężenia α-klotho, wieku, płci, wskaźnika BMI, stężenia lipidów, nasilenia białkomoczu, wysokości ciśnienia tętniczego i chorób współistniejących.

Doktorantka nie wykazała również wpływu stężenia sirtuiny 1 w surowicy na wyniki dotyczące przeżycia w okresie 24 - miesięcznej obserwacji.

Na szczególną rolę zasługują dane wynikające z analizy przydatności SIRT1 jako markera uszkodzenia nerek. Kandydatka wykazała, że stężenie sirtuiny 1 odróżnia z wysoką czułością (93%) i swoistością (87%) grupę badaną od grupy kontrolnej (punkt odcięcia 0,96 ng/ml; AUC = 0,954, 95% CI 0,919-0,989).

W kolejnej części zbioru dokumentów Kandydatka omawia zależności pomiędzy stężeniem białka α-klotho a zaawansowaniem PChN. Wraz ze stopniem zaawansowania choroby stwierdziła postępujący spadek stężenia badanego białka, a jego stężenie było istotnie statystycznie niższe w grupie pacjentów z umiarkowanym i ciężkim upośledzeniem funkcji nerek w porównaniu do osób z łagodnym upośledzeniem oraz prawidłową funkcją filtracyjną. Doktorantka wykazała się krytycznym spojrzeniem na wyniki uzyskane z badań własnych i pomimo, że wykazała korelację białka α-klotho z konwencjonalnymi markerami PChN oraz wartością eGFR uznała, że nie stanowią podstawy do stwierdzenia użyteczności białka jako markera choroby stwierdzając, że stężenie białka α-klotho może być wykładnikiem zespołu metabolicznego charakteryzującego pacjentów z uszkodzeniem nerek

Kandydatka wykazując się umiejętnością dyskusji otrzymanych wyników, w sposób dojrzały przeprowadziła omówienie wyników w zakresie dostępnego piśmiennictwa w tej tematyce. Na szacunek zasługuje umiejętność analizy krytycznej do uzyskanych wyników.

Wnioski prezentowane w cyklu prac odpowiadają na postawione tezy dowodząc istotny związek sirtuiny 1 ze stopniem uszkodzenia nerek i wskazując na potencjalną rolę SIRT1 jako markera uszkodzenia nerek.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na brak wykazu skrótów stosowanych w pracy, tym bardziej, że niektóre skróty pozostały bez wyjaśnienia zarówno w języku angielskim jak i polskim. Brak jest również wykazu rycin. Pewien niedosyt budzi fakt braku opublikowania wyników związanych z białkiem α-klotho, niemniej jednak wyniki z przeprowadzonych badań przedstawione w rozdziale 4.5. nie budzą wątpliwości danych znaczących.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska lek. med. Angeliki Biełach-Bazyluk jest przykładem kompleksowego, dobrze zaplanowanego badania klinicznego o ważnych implikacjach

praktycznych. Wnioski wynikające z pracy powinny utwierdzić w przekonaniu wszystkich lekarzy odpowiedzialnych za leczenie chorych z PKZN o konieczności poszukiwania nowych, wczesnych markerów uszkodzenia nerek co może istotnie wpływać na podjęcie działań terapeutycznych hamujących progresję choroby a także powikłań sercowo-naczyniowych w tej populacji pacjentów.

Mając powyższe na uwadze, wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. med. Angeliki Biełach-Bazyluk do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim, gdyż przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie kryteria określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (art. 13. ust. Ustawy z dnia 14.03.2003r; Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018r poz. 1669 z późn. zm.)

dr hab. n.med. Katarzyna Krzanowska, prof. UJ
Katedra i Klinika Nefrologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Katarzyna Krzanowska

KIEROWNIK
Oddziału Klinicznego
Oddział Kliniczny Nefrologii i Dializoterapii
Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie

prof. nzw. dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska