Gdańsk, 10/06/2018

dr hab. med. Sławomir Lizakowski
Klinika Nefrologii, Transplantologii
i Chorób Wewnętrznych
Gdański Uniwersytet Medyczny

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Rygasiewicz zatytułowanej
„Czynnik wzrostu fibroblastów 23 u pacjentów leczonych w Oddziale Intensywnej Terapii"

Ostre uszkodzenie nerek (AKI, *acute kidney injury*) jest częstym problemem u chorych hospitalizowanych na oddziałach intensywnej terapii (OIT), bowiem zespól ten rozpoznaje się nawet u około 40% dorosłych pacjentów leczonych w tych oddziałach. W badaniu *DOse REsponse Multicentre International Collaborative Initiative* (Do-Re-Mi) odsetek pacjentów z AKI wymagających zastosowania terapii nerkozastępczej (RRT, *renal replacement therapy*) wynosił prawie 4%, a w międzynarodowym, wieloośrodkowym badaniu *The Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney* (BEST) sięgał aż 6%. Ostre uszkodzenie nerek to rokowniczo niekorzystny zespół chorobowy, gdyż niezależnie od stopnia uszkodzenia narządu i po uwzględnieniu dodatkowych obciążeń i chorób współistniejących, zwiększa ryzyko przejścia choroby w przewlekłą lub schyłkową niewydolność nerek, zwiększa śmiertelność wczesną i późną, generuje większe koszty leczenia oraz pogarsza jakość życia chorych. Śmiertelność chorych z AKI wymagającym zastosowania RRT sięga 60%

Wobec złego rokowania u chorych, u których wystąpiło AKI, od wielu lat poszukiwane są wczesne markery mające na celu wykrycie chorych z ryzykiem wystąpienia tego zespołu. Dotychczasowe oznaczenia laboratoryjne (np. stężenie kreatyniny i cystatyny C w surowicy) są późnymi wskaźnikami upośledzenia czynności wydalniczej nerek, natomiast nowsze związki wskazujące na ich uszkodzenie, takie jak lipokalina neutrofilowa związana z żelatynazą (NGAL neutrophil gelatinase-associated lipocalin), czy też cząsteczka 1 uszkodzenia nerek (KIM-1; kindney injury molekule -1) nie odpowiadają definicji idealnego markera wczesnego uszkodzenia nerek i nie spełniły podkładanych w nich w tym zakresie nadziei. Trwają więc poszukiwania wskaźnika, na podstawie którego można byłoby wcześnie rozpoznać ostre uszkodzenie nerek i wdrożyć odpowiednie działania zapobiegawcze.

Ostatnie lata przyniosły obiecujące odkrycia dotyczące wykorzystania czynnika wzrostu fibroblastów 23 (FGF-23; Fibroblast growth factor-23) zarówno do diagnostyki AKI, jak i prognozowania jego przebiegu. FGF-23 jest fosfatoniną, czyli krążącym czynnikiem fosfaturycznym, biorącym udział na zasadzie szeregu sprzężeń zwrotnych wraz z PTH i kalcytriolem w utrzymaniu homeostazy wapniowo-fosforanowej

Do swojego zasadniczego działania FGF-23 wymaga białka koreceptorowego, którym jest białko Klotho. W ostatnich latach "klasyczny" pogląd na działanie FGF-23 jedynie za pośrednictwem białka Klotho został zakwestionowany, gdyż udowodniono, że FGF-23 może oddziaływać z FGFR również bez udziału swoistego koreceptora. Dzieje się tak w przypadku występowania suprafizjologicznych stężeń tego hormonu, jakie spotyka się np. u pacjentów z PChN. Wykazano, że FGF-23 wywołuje u tych pacjentów przerost kardiomiocytów, poprzez szlak fosfolipaza Cγ-kalcyneuryna, w sposób niezależny od Klotho. Postuluje się, że mechanizm ten może odgrywać kluczową rolę w obserwowanym związku pomiędzy wysokim stężeniem FGF-23 a zwiększoną śmiertelnością, incydentami sercowo-naczyniowymi, przerostem lewej komory, postępem PChN czy złamaniami, co przekłada się na zwiększoną śmiertelność w tej grupie chorych.

Obecnie wzrasta zainteresowanie FGF-23 u pacjentów z ostrym uszkodzeniem nerek. Jak wykazano chorzy z AKI charakteryzują się podwyższonym stężeniem tego hormonu i co istotne, stężenie to wzrasta znacznie wcześniej niż stężenie klasycznego wskaźnika funkcji nerek jakim jest kreatynina. Wzrost stężenia FGF-23 pojawia się już po godzinie od wywołania doświadczalnego AKI. W chwili obecnej mechanizm prowadzący do wzrostu tej fosfatoniny w ostrym uszkodzeniu nerek jest nieznany. Jak wykazano w ostatnich latach, oznaczenie stężenia FGF-23 wykazuje także przydatność do identyfikacji pacjentów, u których istnieje wysokie ryzyko wystąpienia AKI po zabiegach kardiochirugicznych. Ponadto wykazano, że pomiar FGF-23 umożliwia prognozowanie przebiegu AKI, przewyższając pod tym względem stężenie kreatyniny.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, uważam, że badania mające na celu ocenę użyteczności FGF-23 jako czynnika prognostycznego i rokowniczego u pacjentów krytycznie chorych leczonych w oddziale intensywnej terapii, są godne uwagi i poparcia. Dlatego temat i cele pracy doktorskiej lek. Karoliny Rygasiewicz należy uznać za aktualne, interesujące i klinicznie istotne.

Rozprawa jest dziełem składającym się z dwóch prac. Pierwsza z nich to praca poglądowa, w której Autorka wraz z współpracownikami, przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów prowadzących do wzrostu FGF-23 w AKI oraz jego użyteczności w prognozowaniu i przebiegu tego zespołu. Druga praca, to praca oryginalna, w której Doktorantka realizuje szczegółowe cele rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana *„Czynnik wzrostu fibroblastów 23 u pacjentów leczonych w Oddziale Intensywnej Terapii„* ma typowy dla tego rodzaju prac układ. Pierwsze strony obejmuje spis treści, wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, zestawienie publikacji Doktorantki nie wchodzących do rozprawy, jak również wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń. Kolejne osiem stron to wstęp, w którym lek. Karolina Rygasiewicz w sposób jasny i precyzyjny przedstawia tło badanych zagadnień, wskazując na zasadność podjętej pracy. Wstęp zakończony zestawieniem aktualnego i dobrze dobranego piśmiennictwa, obejmującym 89 pozycji. Następny rozdział stanowi omówienie pracy stanowiącej zasadniczą część rozprawy doktorskiej. Na trzech stronach Doktorantka opisuje cele i metodykę pracy, przedstawia uzyskane wyniki i wyciągnięte wnioski. Rozdział 6 to publikacje stanowiące rozprawę doktorską, po których następuje streszczenie w języku polskim i angielskim, a następnie zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Całość rozprawy zamykają oświadczenia zgody współautorów prac na ich wykorzystanie w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Publikacja pierwsza to artykuł poglądowy zatytułowana *„Czy warto oznaczać FGF-23 u chorych z ostrym uszkodzeniem nerek ?"* przyjęty do druku w czasopiśmie Przegląd Lekarski. Już sam tytuł tej pracy, ciekawie skomponowany, zachęca do jej lektury i analizy. W pracy tej przedstawione zostały aspekty analityczne oznaczania stężeń FGF-23 oraz aktualne informacje dotyczące jego roli w stanach fizjologii i patologii, ze szczególnym naciskiem na ostre uszkodzenie nerek. Publikacja stanowi wartościowy przegląd obecnego stanu wiedzy i przeprowadzonych badań w zakresie możliwości wykorzystania FGF-23 jako wczesnego markera uszkodzenia nerek oraz czynnika prognostycznego w tym zespole. Zakres przedstawionych w pracy wiadomości bardzo dobrze świadczy o wiedzy Autorki oraz umiejętności syntetycznego przedstawienia tej tematyki. Artykuł jest też doskonałym wstępem dla pracy oryginalnej stanowiącej zasadniczą część rozprawy. Praca ta nosi tytuł *„C-terminal and intact FGF23 in critical illness and their associations with acute kidney injury*

and in-hospital mortality" i została opublikowana w renomowanym czasopiśmie Cytokine o współczynniku oddziaływania 3,488 (2018 : 103, s. 15-19). Cele pracy zostały sformułowane jasno i czytelnie. Doktorantka w sposób przemyślany, z niezwykłą starannością opracowała metodykę badań, zgodnie z Deklaracją Helsińską, po uprzedniej zgodzie wydanej przez Komisję Bioetyczną UM w Białymstoku. Jest to jednoośrodkowe badanie kohortowe przeprowadzone wśród pacjentów przyjmowanych do OIT, u których stężenie FGF-23 w osoczu zostało oznaczone w ciągu 24 godzin od przyjęcia na oddział. Jasno zostały sprecyzowane pierwszo- i drogorzędowe punkty końcowe, którymi były odpowiednio: ostre uszkodzenie nerek oraz śmiertelność wewnątrzszpitalna podczas pobytu w OIT i długość hospitalizacji w OIT oraz czas trwania wentylacji mechanicznej i konieczność wdrożenia terapii nerkozastępczej. Do badania włączono 79 pacjentów, u 12 z nich (15%) rozpoznano AKI, a 24 (30%) zmarło w trakcie hospitalizacji. Pacjenci, u których wystąpił pierwszorzędowy punkt końcowy charakteryzowali się wyższym stężeniem cFGF-23 (p <0,001). Przy pomocy analizy ROC ustalono stężenie cFGF-23 ≥ 135,9 RU/ml jako wartość predykcyjną AKI (AUC 0,81). Przy użyciu krzywych przeżycia Kaplana-Meiera wykazano istotną różnicę w częstości występowania AKI (test log-rank p <0,001) po stratyfikacji grup względem wyznaczonej za pomocą analizy ROC wartości predykcyjnej cFGF23 (stężenie cFGF-23 ≥ 135,9 RU/ml). Wieloczynnikowa analiza regresji logistycznej po uwzględnieniu wieku, płci, wyjściowej funkcji nerek, cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, choroby niedokrwiennej serca, przewlekłej niewydolności serca oraz przewlekłej obturacyjnej choroby płuc wykazała, że cFGF-23 i wyjściowa funkcja nerek są niezależnymi predyktorami wystąpienia AKI. Autorzy wykazali także, że stężenie c-FGF-23 w momencie przyjęcia do OIT powyżej 72,59 RU/ml jest wartością predykcyjną zgonu. Ponadto stężenie c-FGF-23 korelowało ze śmiertelnością wewnątrzszpitalną w analizie jednoczynnikowej (OR 2,48; 95% CI 1,50-4,10), a po uwzględnieniu wieku, płci, punktacji APACHE II, wyjściowej czynności nerek, wystąpienia AKI, cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, przewlekłej niewydolności serca, choroby niedokrwiennej serca i POChP, wykazano, że stężenie c-FGF-23 w osoczu i klasyfikacja APACHE II są niezależnymi predyktorami zgonu w trakcie hospitalizacji w OIT. Oceniając drugorzędowe punkty końcowe stwierdzono, ze stężenie c-FGF-23 korelowało z długością wentylacji mechanicznej (β=0.20, p=0.08) na granicy istotności statystycznej. Nie wykazano istotnych powiązań pomiędzy koniecznością wdrożenia RRT lub długością pobytu w szpitalu.

W opublikowanych pracach Doktorantka wykazuje bardzo dobrą znajomość podejmowanego tematu. Obie prace stanowiące rozprawę doktorską zostały napisane w sposób jasny i przejrzysty. Metodyka pracy oryginalnej, jak również analiza statystyczna jest dobrana prawidłowo, a uzyskane wyniki nie budzą wątpliwości. Na jej podstawie, po rzeczowej i ciekawej dyskusji, Doktorantka wyciąga następujące wnioski:

1. Stężenie c-FGF-23 jest niezależnym czynnikiem predykcyjnym wystąpienia ostrego uszkodzenia nerek oraz zgonu u pacjentów krytycznie chorych hospitalizowanych w oddziale intensywnej terapii.
2. Pomiar stężenia c-FGF-23 może być użytecznym biomarkierem służącym do identyfikacji chorych w OIT o niepomyślnym rokowaniu.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam nieliczne uwagi, które nasunęły mi się w trakcie studiowania rozprawy:

1. Wobec tego, że PChN jest uznanym niezależnym czynnikiem ryzyka AKI (badania FINNAKI i PICARD) oraz podnoszonej przez Doktorantkę we wstępie problematyki suprafizjologicznych stężeń FGF-23 u chorych z PChN, wydaje się wskazane przedstawienie w tabeli 1 (praca 2), liczby chorych z PChN rozpoznawaną przed przyjęciem do OIT. Jest to ważne tym bardziej, że w prezentowanym badaniu w grupie AKI stwierdzano znamiennie niższy eGFR w punkcie „O" tj. w ciągu 24 h od przyjęcia do OIT.
2. Wobec zamiennie wyższego wieku chorych w grupach „AKI" i „Zgon" oraz znanego wyższego ryzyka rozwoju AKI u starszych, wydaje się istotne przedstawienie krótkiego komentarza dotyczącego tego zagadnienia (pomimo tego, że wiek w analizie wieloczynnikowej nie był elementem wpływającym na stężenie cFGF23 w badanej grupie chorych, co jednoznacznie wykazała Doktorantka)
3. Czy nie byłoby zasadne ocenianie stężenia cFGF-23 w moczu (jako wskaźnik stężenie cFGF-23/stężenie kreatyniny) ? Który z parametrów jest lepszy do oceny ryzyka rozwoju AKI: cFGF-23 w surowicy czy w moczu ?
4. Jaki był związek pomiędzy parametrami gospodarki wapniowo-fosforanowej a stężeniem FGF-23 oraz ich wpływ na punkty końcowe.
5. W mojej ocenie dość istotnej jest ustalenie, że w ocenianej grupie chorych istotne znaczenie ma oznaczanie cFGF23, a nie iFGF23, co Doktorantka podnosiła w dyskusji

zawartej w pracy oryginalnej, a można byłoby zawrzeć w przedstawionych wnioskach pracy doktorskiej.

Wyżej wymienione uwagi w żadnej mierze nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej przeprowadzonych badań, znaczącej pracy włożonej przez Doktorantkę w zaplanowanie pracy, przeprowadzenie analiz, obliczeń statystycznych i przygotowanie publikacji, jak również samej rozprawy doktorskiej. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą, dużą dojrzałością w zakresie przeprowadzania badań i analizowania uzyskanych wyników.

W oparciu o powyższe omówienie pracy stwierdzam, że Doktorantka odpowiedziała na postawione pytania badawcze, wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy naukowej oraz interpretacji uzyskanych wyników i stwierdzam, że przedstawiona rozprawa pt. *„Czynnik wzrostu fibroblastów 23 u pacjentów leczonych w Oddziale Intensywnej Terapii"* spełnia wszystkie kryteria określone w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w dziedzinie sztuki z dnia 14 marca 2003 r.

Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Karoliny Rygasiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Sławomir Lizakowski