Gdańsk, 22.07. 2021 r.

prof. dr hab. med. Michał Chmielewski
Klinika Nefrologii, Transplantologii
i Chorób Wewnętrznych
Gdański Uniwersytet Medyczny

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ LEK. ANGELIKI BIEŁACH-BAZYLUK

PT. „ZNACZENIE SIRTUINY 1 i α-KLOTHO JAKO BIOMARKERÓW PRZEWLEKŁEJ CHOROBY NEREK ORAZ JEJ POWIKŁAŃ"

Schorzenia sercowo-naczyniowe są powszechnym powikłaniem przewlekłej choroby nerek (PChN). Ryzyko niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych, w tym śmiertelności, jest w tej grupie chorych znacznie wyższe, w porównaniu z porównywalną wiekowo populacją ogólną. Obok tradycyjnych czynników nasilających ryzyko sercowo-naczyniowe, takich jak dyslipidemia, nadciśnienie tętnicze, czy otyłość, duże znaczenie w PChN mają tzw. czynniki nietradycyjne, do których zalicza się między innymi: stres oksydacyjny, przewlekły stan zapalny, czy zaburzenia wapniowo-fosforanowe. Ich rola rośnie w miarę postępu PChN, przyczyniając się do złego rokowania pacjentów. Poznanie i zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za ryzyko sercowo-naczyniowe w toku PChN jest niezbędne dla właściwego leczenia chorych, jest nieodzowne dla poprawy rokowania pacjentów.

Sirtuina 1, należąca do rodziny enzymów o aktywności deacetylazy histonowej, odpowiada za potranslacyjną modyfikację białek i regulację epigenetyczną ekspresji genów w zależności od stanu energetycznego komórki. Bierze udział w regulacji odpowiedzi na stres oksydacyjny, zapalenie, funkcje mitochondriów, apoptozę, gospodarkę lipidową i węglowodanową. W badaniach doświadczalnych wykazano jej potencjał nefroprotekcyjny.

Białko α-klotho, enzym o właściwościach β-glukuronidazy, zapobiega szeregowi procesów zapalnych i degeneracyjnych. Jego niedobór w PChN jest między innymi współodpowiedzialny za zaburzenia wapniowo-fosforanowe charakterystyczne dla tej choroby i będące jednym z głównych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego w PChN.

Istnieją przesłanki świadczące, że działanie białka klotho w naczyniach krwionośnych odbywa się z udziałem sirtuiny 1.

Biorąc pod uwagę powyższe dane, badania mające na celu ocenę stężenia sirtuiny 1 i białka klotho w surowicy pacjentów z PChN leczonych zachowawczo oraz ustalenie zależności pomiędzy badanymi białkami a stopniem zaawansowania choroby, analiza wzajemnych relacji pomiędzy sirtuiną 1, α-klotho i współistnieniem chorób sercowo-naczyniowych, należy uznać za aktualne, interesujące i klinicznie istotne.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma typowy dla tego rodzaju prac układ. Po wykazie publikacji stanowiących rozprawę doktorską i zestawieniu wszystkich publikacji Doktorantki, następuje wprowadzenie. Doktorantka przedstawia w nim zagadnienia przewlekłej choroby nerek jako czynnika ryzyka sercowo-naczyniowego, przedstawia pokrótce dotychczasowy stan wiedzy na temat sirtuiny-1 i białka klotho. Następnie omawia prace składające się na rozprawę doktorską. Pierwszą jest praca poglądowa zatytułowana „State of the art – sirtuin 1 in kidney pathology – clinical relevance", opublikowana w 2019 roku w Advances in Medical Sciences. Autorka opisuje dotychczasowy stan wiedzy w tematyce wpływu sirtuiny 1 na funkcję nerek, zarówno własnych jak i przeszczepionych. Przedstawia zależności i potencjalny wpływ aktywności sirtuiny 1 na schorzenia nerek takie jak: rak nerki, wielotorbielowatość typu dorosłego, czy nefropatia toczniowa. Treść pracy, sposób jej prezentacji, a także dobór piśmiennictwa świadczą o dogłębnej znajomości tematyki, naukowej i klinicznej dojrzałości Doktorantki.

Podstawą prezentowanej rozprawy doktorskiej jest praca oryginalna, zatytułowana „Serum sirtuin 1 is independently associated with intact PTH among patients with chronic kidney disease", opublikowana z czasopiśmie Clinical Interventions in Aging w roku bieżącym oraz analiza stężenia białka klotho w tej samej grupie pacjentów.

Badaniem objęto 100 chorych z PChN oraz grupę kontrolną 24 zdrowych ochotników, dobranych pod względem wieku i płci. Stężenie sirtuiny 1 oraz białka klotho było wyższe w grupie badanej w porównaniu do kontrolnej. Wraz ze spadkiem filtracji kłębuszkowej stwierdzono stopniowo wzrastające stężenia sirtuiny 1 i klotho. W analizie wieloczynnikowej wykazano, że jedynym niezależnym predyktorem stężenia sirtuiny 1 w surowicy jest stężenie parathormonu.

Praca została napisana w sposób jasny i przejrzysty, a na podstawie jej wyników Doktorantka wyciąga następujące wnioski:

1. Stężenie sirtuiny 1 w surowicy pacjentów z przewlekłą chorobą nerek jest istotnie wyższe niż u osób zdrowych.

2. Sirtuina 1 z wysoką czułością i swoistością różnicuje osoby z PChN i zdrowe, dlatego może stanowić nowy marker upośledzenia funkcji nerek.

3. Podwyższone stężenie sirtuiny 1 w surowicy może wynikać z jej akumulacji z powodu upośledzonej funkcji nerek.

4. Silna zależność pomiędzy stężeniem sirtuiny 1 a iPTH sugeruje użyteczność białka jako biomarkera funkcji nerek lub pośrednio markera sercowo-naczyniowego.

5. W kontekście iPTH, jako jedynego niezależnego predyktora stężenia sirtuiny, może być ona rozpatrywana jako marker ryzyka sercowo-naczyniowego, niezależny od funkcji nerek.

6. Sirtuina 1 jest znana z właściwości kardio- i nefroprotekcyjnych, w związku z czym podwyższone stężenie białka w surowicy może być mechanizmem kompensacyjnym towarzyszącej zmniejszonej aktywności sirtuiny 1.

7. Alternatywnie, korelacja pomiędzy sirtuiną 1 i iPTH, może zależeć od akumulacji fragmentów (7-84) - PTH, o przeciwstawnych właściwościach biologicznych do pełnołańcuchowego PTH.

8. Stężenie α-klotho w surowicy koreluje z upośledzeniem funkcji nerek, ale nie jest wystarczająco czułym markerem choroby.

9. Obniżone stężenie białka α-klotho może być wykładnikiem zespołu metabolicznego i podwyższonego ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjentów z PChN.

Na kolejnych stronach znajdują się reprinty obu prac oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dzieło zamykają oświadczenia współautorów prac o wyrażeniu zgody na wykorzystanie poszczególnych publikacji w postępowaniu o nadanie tytułu.

Zarówno praca poglądowa, jak i oryginalna zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach i jako takie, przeszły przez proces wnikliwej recenzji.

Być może gdybym był recenzentem pracy oryginalnej, zwróciłbym uwagę na znaczną, bo sięgającą 24 lata, różnicę w średniej wieku, dobranych jakoby pod względem wieku grup. Różnica ta, choć nie sięgnęła poziomu istotności statystycznej, miała niewątpliwy wpływ na uzyskane wyniki, jako że stężenie sirtuiny 1 z wiekiem się zmienia, co wykazała również niniejsza analiza.

Jest to jednak jedyna znacząca uwaga do obu opublikowanych prac, które, poza tym, przeczytałem z przyjemnością i zaciekawieniem.

Moje wątpliwości dotyczące samej rozprawy odnoszą się w głównej mierze do przedstawionych przez Doktorantkę wniosków.

Pewien opór budzi we mnie twierdzenie z wniosku 2 i 4, że sirtuina1 „może stanowić nowy marker upośledzenia funkcji nerek". Wydaje się pewne, że sirtuina nigdy takim markerem się nie stanie. Na podstawie samej rozprawy, jak również informacji z pracy poglądowej Doktorantki nie widać jakichkolwiek przewag sirtuiny nad klasycznymi wykładnikami funkcji nerek: kreatyniną, mocznikiem, eGFR, czy cystatyną C. W analizie prezentowanej w rozprawie (na rycinie 2 pracy oryginalnej), mediana stężenia sirtuiny 1 okazała się właściwe niezmienna w bardzo szerokim zakresie PChN, od stadium 3a, po stadium 4, czyli dla wartości przesączania kłębuszkowego od 59 aż po 15 ml/min. Trudno spodziewać się, żeby tak nieprecyzyjny wykładnik stopnia niewydolności nerek, którego oznaczenie jest w dodatku znacząco droższe od oznaczenia chociażby stężenia kreatyniny, był kiedykolwiek wykorzystywany jako marker funkcji nerek, czy to doświadczalnie, czy klinicznie.

Podobnie nieuprawnionym wydaje się przedstawienie sirtuiny jako markera ryzyka sercowo-naczyniowego, jak to uczyniono we wniosku 4 i 5. W przedstawionej pracy wykazano przecież brak zależności pomiędzy stężeniem sirtuiny a chorobami sercowo-naczyniowymi. Sam związek ze stężeniem parathormonu nie wystarcza, żeby prezentować sirtuinę jako wykładnik ryzyka sercowo-naczyniowego.

Wniosek 3 sugerujący akumulację sirtuiny z powodu upośledzonej funkcji nerek, wniosek 6 dotyczący potencjalnych mechanizmów kompensacyjnych, oraz wniosek 7 traktujący o

powiązaniach pomiędzy sirtuiną a PTH są w istocie hipotezami badawczymi, a nie wnioskami, jako że wymagają dalszych badań, a prezentowana analiza tych zagadnień nie wyjaśnia.

Z pomniejszych uwag, należy skorygować drobne błędy redakcyjne, jak chociażby ten w części omawiającej wyniki dotyczące sirtuiny 1, gdzie Doktorantka pisze, że „wykazano istotną korelację pomiędzy stężeniem sirtuiny 1 w surowicy oraz wiekiem", podczas gdy trzy linijki niżej twierdzi, że „nie wykazano zależności sirtuiny 1 od wieku".

Wyżej wymienione uwagi w żaden sposób nie umniejszają 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, dojrzałością w zakresie przeprowadzania badań i analizowania uzyskanych wyników.

Podsumowując, wysoko oceniam merytoryczną wartość pracy: trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność oraz uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki. Docenić również należy metodologiczny aspekt rozprawy: dobór literatury, poprawność formułowania założeń badawczych, dobór metod i narzędzi badawczych.

W związku z tym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa pt. „Znaczenie sirtuiny 1 i α-klotho jako biomarkerów przewlekłej choroby nerek oraz jej powikłań" spełnia wymagania stawiane przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku pracom doktorskim. Zwracam się zatem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Angeliki Biełach-Bazyluk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Michał Chmielewski