Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Katedra i Klinika Nefrologii Pediatrycznej
ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław; sekretariat: tel. 71736 44 00, fax 71736 44 09

Prof. zw. dr hab. med. Katarzyna Kiliś-Pstrusińska

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz medycyny pani Hanny Nosek „Ocena stężenia podobnego do czynnika martwicy nowotworów induktora apoptozy (TWEAK) oraz wybranych markerów włóknienia u dzieci z jedyną nerką."

Rozprawa doktorska została przygotowana przez lekarz Hannę Nosek na podstawie dwóch publikacji:

1. Hanna Nosek, Dorota Jankowska, Karolina Brzozowska, Katarzyna Kazberuk, Anna Wasilewska, Katarzyna Taranta-Janusz: *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and selected cytokines - potential biomarkers in children with solitary functioning kidney.* Journal of Clinical Medicine 2021, *10* (3), 497; doi: 10.3390/jcm10030497. IF 3,303; MNiSW 140
2. Hanna Nosek, Leszek Janusz, Anna Wasilewska, Katarzyna Taranta-Janusz: *Podobny do czynnika martwicy nowotworów induktor apoptozy (TWEAK) w chorobach nerek – biomarker czy cel terapeutyczny?* Pediatria i Medycyna Rodzinna 2020, 16 (3), p. 251–256, doi: 10.15557/PiMR.2020.0046 MNiSW 20

Pierwsza praca ma charakter oryginalny, druga przeglądowy. Sumaryczna punktacja prac wynosi: IF-3,303; MNiSW-160. Lekarz Hanna Nosek jest pierwszym autorem obydwóch prac. Indywidualny udział Autorki w ich powstaniu został jednoznacznie określony, wynosi 60% w każdej publikacji i stanowi własny dorobek Kandydatki. Złożoność problematyki badawczej i zastosowanych metod w pełni uzasadnia zespołowy charakter prowadzenia badań i publikacji wyników. Współautorzy prac złożyli stosowne pisemne oświadczenia dotyczące udziału w przygotowaniu powyższych publikacji i wyrazili zgodę na ich wykorzystanie w pracy doktorskiej lekarz Hanny Nosek.

Z dużym zainteresowaniem zapoznałam się z przedłożoną rozprawą doktorską. Jej przedmiotem była oceny stężenia wybranych białek w surowicy i w moczu u dzieci z jedyną nerką.

Obecność tylko jednej nerki u dzieci może być wynikiem wrodzonej wady układu moczowego lub następstwem nefrektomii np. po urazie czy wskutek wrodzonej anomalii. W przeszłości uważano, że posiadanie jedynej nerki nie masz większego klinicznego znaczenia. Pogląd ten wynikał z pozytywnej prognozy dla żyjących dawców nerek. Jednak w ostatnich latach, między innymi dzięki badaniu o akronimie KIMONO (KIdney of MONofunctional Origin), spojrzenie na tę kwestię uległo zmianie. Jedyna nerka musi wykonać pracę typową dla dwóch, co prowadzi do hiperfiltracji nefronów, przerostu kompensacyjnego nerki, czego skutkiem może być jej uszkodzenie z nadciśnieniem tętniczym, albuminurią i pogorszeniem czynności nerki, wiodącym do zaawansowanych stadiów przewlekłej choroby nerek (PChN). Wiadomo także, opierając się na tym samym badaniu, że nie u wszystkich osób z jedną czynną nerką dojdzie do rozwoju jej niewydolności. Pomimo prowadzenia intensywnych badań doświadczalnych i klinicznych, nie udało się w pełni wyjaśnić złożonych mechanizmów determinujących funkcję jedynej nerki. Brakuje wskaźników pozwalających na zróżnicowanie grupy osób ze standardowym ryzykiem rozwoju PChN i tych z podwyższonym ryzykiem. Określenie pacjentów zagrożonych rozwojem PChN, wczesne jej rozpoznanie przed wystąpieniem klinicznych objawów i adekwatne leczenie chorych, mają konsekwencje nie tylko osobnicze, ale i ogólnospołeczne.

Poszukiwane są nowe biomarkery wczesnych zaburzeń czynności nerek o wysokiej czułości i swoistości, nie tylko u osób z wadami układu moczowego. Od wielu lat przedmiotem badań są cytokiny MCP-1 (ang. monocyte chemoattractant protein-1, białko chemotaktyczne monocytów-1) oraz RANTES (ang. regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted, chemokina beta syntetyzowana przez limfocyty T). Relatywnie nowym biomarkerem budzącym coraz większe zainteresowanie badaczy jest białko TWEAK (ang. tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis), należące do rodziny TNF i odgrywające istotną rolę aktywatora apoptozy. Białko to do tej pory nie było przedmiotem badania u chorych z jedną funkcjonująca nerką.

Z przytoczonych danych wynika, że tematyka badań podjętych przez Doktorantkę jest oryginalna, nowatorska i niezwykle aktualna. Wyniki pracy z udziałem Doktorantki dzięki pionierskim obserwacjom mają ogromne znaczenie poznawcze i kliniczne W związku z

powyższym jeszcze raz podkreślam innowacyjność i wagę badań przeprowadzonych przez Doktorantkę pod kierunkiem profesor Katarzyny Taranty-Janusz.

Przedłożona dysertacja, licząca 67 stron, zawiera wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, liczbowe zestawienie prac Doktorantki, wstęp, publikacje stanowiące rozprawę doktorską poprzedzone omówieniem prac (w pracy oryginalnej z wyszczególnieniem: cele pracy, materiał i metody, metody statystyczne, wyniki i wnioski), streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa, ponadto stosowne oświadczenia współautorów, scharakteryzowane powyżej. W ocenie redakcyjnej należy podkreślić wysoką staranność edytorską. Język rozprawy jest precyzyjny i logiczny, przez co dysertacja zyskuje na użyteczności naukowej i klinicznej.

Celem badań przedstawionych w pracy oryginalnej *(Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and selected cytokines - potential biomarkers in children with solitary functioning kidney.* Journal of Clinical Medicine 2021, *10* (3), 497;) było:

1. Ocena stężenia TWEAK w surowicy oraz wydalania MCP-1 i RANTES w moczu u pacjentów z wrodzonym i nabytym brakiem jednej nerki oraz w grupie referencyjnej.
2. Sprawdzenie, czy TWEAK oraz cytokiny MCP-1 i RANTES, mogą służyć, jako potencjalne wskaźniki wczesnego upośledzenia funkcji nerki u dzieci z jedyną nerką.
3. Określenie stężenia w surowicy TWEAK oraz cytokin MCP-1 i RANTES w moczu stanowiącego punkt podziału pomiędzy pacjentami z jedyną nerką z towarzyszącą upośledzoną funkcją nerek (albuminurią i/ lub obniżonym eGFR <90mL/min/1,73m2 i/ lub nadciśnieniem tętniczym), a pacjentami z prawidłową funkcją nerek.

Cele pracy są interesujące, właściwie sformułowane i dobrze wpisują się w aktualne obszary badań u pacjentów z jedyną funkcjonującą nerką.

Badanie zostało starannie zaplanowane, a w pracy szczegółowo scharakteryzowano grupę badawczą i referencyjną, precyzyjnie podano kryteria włączenia i wyłączenia, zastosowane metody i oznaczenia laboratoryjne. Dokładność informacji z tego zakresu pozwala na powtórzenie badania, co stanowi o wysokiej jakości przeprowadzonego eksperymentu badawczego.

Na podkreślenie zasługuje fakt patofizjologicznych powiązań pomiędzy analizowanymi biomarkerami. M.in. w pracy Sanza i wsp., w modelu mysim wykazano, że TWEAK, oprócz bezpośredniej indukcji reakcji zapalnej, stymuluje także komórki śródbłonka, podocyty i komórki mezangialne do sekrecji cytokin, w tym RANTES i MCP-1.

Wyniki badania przedstawiono przejrzyście, analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń. Autorka stwierdziła m.in. cechy upośledzonej funkcji nerek objawiające się albuminurią i/ lub obniżonym eGFR <90mL/min/1,73m2 i/ lub nadciśnieniem tętniczym u 65% dzieci z jedyną funkcjonująca nerką, w szczególności obecność albuminurii u 47,5% pacjentów, eGFR <90mL/min/1,73m2 u 55%, a nadciśnienia tętniczego u 15%. Na uwagę zasługuje wykazanie w grupie dzieci z jedyną funkcjonującą nerką w stosunku do grupy referencyjnej: istotnie wyższego stężenia kreatyniny i TWEAK w surowicy oraz istotnie wyższego wydalania z moczem MCP-1 oraz RANTES. Odnotowano ponadto brak różnic stężeń TWEAK w surowicy i wydalania z moczem RANTES pomiędzy osobami z wrodzoną agenezją nerki i po nefrektomii. Wyższe wydalanie MCP-1 wykazano jedynie u pacjentów z agenezją nerki w stosunku do grupy referencyjnej, nie stwierdzając takiej zależności pomiędzy pacjentami po nefrektomii a pacjentami z grupy referencyjnej

W oparciu o analizę krzywej operacyjno-charakterystycznej ROC stwierdzono dobry profil diagnostyczny stężenia TWEAK w surowicy (AUC 0,853); uRANTES (AUC 0,757) oraz RANTES/kr. (AUC 0,816) dla identyfikacji dzieci z jedyną nerką. Z kolei analiza ROC przeprowadzona w celu identyfikacji dzieci z upośledzoną funkcją nerek (albuminurią i/ lub obniżonym eGFR <90mL/min/1,73m2 i/ lub nadciśnieniem tętniczym) wśród pacjentów z jedyną nerką wykazała dobry profil dla TWEAK w surowicy (AUC 0,79) oraz dość dobry profil dla uRANTES oraz RANTES/kr. (odpowiednio AUC 0,66 i 0,631). Na podstawie metody drzew klasyfikacyjnych CAART określono wartość stężenia TWEAK w surowicy (395,628 pg/mL) jako optymalną dla odróżnienia pacjentów z cechami upośledzenia funkcji nerek od pacjentów z prawidłową czynnością nerek, ponadto wartość ta była zbliżona do wartości punktu odcięcia w analizie krzywej ROC, co wzmacnia znaczenia badanego biomarkera.

Wnioski pracy (cytuję: *„1. Stężenie TWEAK w surowicy oraz wydalanie RANTES w moczu mogą stanowić nowe biomarkery służące do identyfikacji pacjentów z jedyną nerką, jednak nie różnicują one pacjentów z wrodzonym i nabytym brakiem nerki. 2. Wydalanie MCP-1 w moczu pozwala na identyfikację jedynie pacjentów z wrodzonym brakiem nerki. 3. Stężenia TWEAK w surowicy powyżej 395,628 pg/mL mogą świadczyć o zwiększonym ryzyku upośledzenia funkcji nerek u pacjentów z jedyną nerką. 4. Stężenia RANTES w moczu powyżej 10,332 pg/mL u osób z jedyną nerką, pozwalają na zakwalifikowanie ich do pacjentów z upośledzoną funkcją nerek. 5. Nie potwierdzono optymalnego stężenia MCP-1 w moczu, które jednoznacznie wskazywałoby na zaburzenia czynności nerek u chorych z jedyną nerką. 6.*

TWEAK i cytokina RANTES mogą służyć jako potencjalne markery wczesnego upośledzenia czynności nerek u pacjentów z jedyną nerką (wrodzoną lub nabytą).") wypływają z uzyskanych wyników, odpowiadają na cele badania i dobrze korespondują z całością pracy.

Uwagi:

- W dysertacji w części Materiał i Metody podano, że badaniem objęto 80 dzieci, w rzeczywistości 120 dzieci. Autorka liczbę 80 pacjentów odniosła do tych z wrodzonym lub nabytym brakiem jednej nerki, a o grupie kontrolnej wspomniała w dalszej części podrozdziału. Trafniej liczba osób biorących udział w badaniu została podana w opublikowanej pracy.
- W artykule wśród kryteriów włączenia pacjentów do grupy badanej podano m.in. potwierdzenie jednej funkcjonującej nerki poprzez usg i renoscyntygrafię dymaniczną. Czy renoscyntygrafia dynamiczna była wykonana u wszystkich dzieci, czy u części z nich scyntygrafia statyczna nerek?
- W pracy przedstawiono dodatnią korelację pomiędzy stężeniem w surowicy TWEAK a kreatyniną. Czy badano korelacje pomiędzy albuminurią – jako wskaźnikiem zaburzenia czynności nerek - a stężeniem MCP-1 i RANTES w moczu?
- W badaniach innych autorów, np. u chorych z nefropatia toczniową, oceniano wydalania z moczem białka TWEAK. Proszę o komentarz w kontekście nie przeprowadzenia tego oznaczenia przez Autorkę.

Należy podkreślić, że praca Doktorantki jest pierwszą w literaturze medycznej, w której oceniano TWEAK u dzieci z jedyną funkcjonującą nerką; nie ma także prac nad wydalaniem RANTES w moczu jako biomarkera wczesnego uszkodzenia nerek w tej grupie.

W dyskusji Doktorantka z dużą swobodą zinterpretowała uzyskane wyniki i, co szczególnie cenne, zaproponowała potencjalne mechanizmy odpowiadające za w/w zależności. Rzeczowość w prowadzeniu wielowątkowej analizy, krytyczna interpretacja danych, świadomość ograniczeń i konkretna propozycja dalszych badań w tym temacie wskazują na dojrzałość naukową pani Hanny Nosek. Co więcej, Doktorantka zwraca uwagę na istotność oznaczania analizowanych biomarkerów w praktyce medycznej, co jest godne uwagi. W dziedzinie klinicznych nauk medycznych istotne są bowiem zarówno poznawcze aspekty prowadzonych prac, jak i przydatność ich wyników dla postępowania z pacjentem.

Piśmiennictwo w pracy oryginalnej (w liczbie 31) i w dysertacji (w liczbie 41 pozycji) jest współczesne, odpowiednio dobrane i prawidłowo cytowane w tekście. Większość prac została opublikowana w ciągu ostatnich piętnastu lat.

Druga praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej pt. „*Podobny do czynnika martwicy nowotworów induktor apoptozy (TWEAK) w chorobach nerek – biomarker czy cel terapeutyczny?*" ma charakter przeglądowy. Jest szczegółowym omówieniem roli TWEAK w patogenezie chorób nerek, poprzedzonym charakterystyką tej cząsteczki, po raz pierwszy opisanej w 1997r. Zamieszczona w pracy bardzo dobrze skonstruowana tabela wymieniająca elementy komórkowe nerek, na które wpływa TWEAK in vitro, z określeniem mechanizmu działania i jego kofaktorów, uzmysławia wielofunkcyjny charakter tego białka. W artykule przedstawiono rolę TWEAK w zapaleniu i włóknieniu nerek. Omówiono wyniki badań eksperymentalnych oraz klinicznych m.in. w nefropatii toczniowej i PChN. Autorka szczególną uwagę zwróciła na oznaczanie TWEAK w surowicy jako potencjalnego wskaźnika rozwoju i progresji PChN oraz nefropatii cukrzycowej, a także ryzyka sercowo-naczyniowego w chorobach nerek. Z kolei oznaczanie TWEAK w moczu może być nieinwazyjnym narzędziem monitorowania przebiegu nefropatii toczniowej. Osobnym zagadnieniem wydaje się być możliwość wykorzystania blokady TWEAK jako sposobu ochrony przed uszkodzeniem nerek i/lub postępem choroby nerek, na co wskazują wyniki badań eksperymentalnych i przedklinicznych. Obydwa aspekty roli TWEAK, tzn. jako biomarkera i jako cel terapeutyczny, zostały omówione. Jakkolwiek tytuł artykułu jest pytaniem, Doktorantka nie udzieliła jednoznacznej odpowiedzi, które z dwóch podejść może być bardziej przydatne w chorobach nerek: zastosowanie TWEAK w strategiach diagnostycznych czy terapeutycznych. Autorka z dużą swobodą porusza się w tym trudnym i wielowątkowym obszarze, wykazując się zarówno szeroką wiedzą ogólną, jak i szczegółową dotycząca chorób nerek, analityczno-syntetyczną umiejętnością interpretacji danych oraz perspektywicznym spojrzeniem badacza.

Do rozprawy doktorskiej zostały włączone dwie prace. Doktorantka nie przedstawiła wniosków wypływających z całości dysertacji, podała je jedynie w omówieniu pracy oryginalnej. Pod względem formalnym takie podejście jest do przyjęcia, jednakże kilka zdań podsumowaniu scaliłoby powiązane ze sobą artykuły.

Podsumowując: Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Podane uwagi nie umniejszają jej wartości. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, jakim jest poszukiwanie biomarkerów, pozwalających na odróżnienie dzieci z jedyną funkcjonująca nerką od posiadających dwie nerki, a także biomarkerów wczesnego uszkodzenia nerek w grupie z jedyną funkcjonującą nerką. Przyjęto poprawną

metodykę i przeprowadzono właściwą analizę wyników. Rozprawa doktorska jest oryginalna, nowatorska, stanowi istotny wkład do wiedzy o mechanizmach uszkodzenia jedynej funkcjonującej nerki. Jej wyniki mają duży potencjał poznawczy i kliniczny.
Doktorantka w swej dysertacji wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy badawczej oraz rozwiązywania problemów naukowych. Podkreślana przez nią możliwość i konieczność prowadzenia dalszych badań celem głębszego wyjaśnienia postawionych zadań badawczych świadczy o kreatywności.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lekarz medycyny pani Hanny Nosek spełnia warunki określone w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. – Dz.U. z 30.01.208r. poz 261 oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.
W związku z powyższym zwracam się do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.
Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy nagrodą z uwagi na jej wybitnie nowatorski charakter i znaczące implikacje poznawczo-kliniczne.

Prof. dr hab. Katarzyna Kiliś-Pstrusińska

Wrocław, dnia 05.04.2021r.