

Sosnowiec, 28.02.2019

Prof. dr hab. n. farm. Joanna Folwarczna
Katedra i Zakład Farmakologii
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. farm. Tomasza Waldemara Kamińskiego
pt. „Siarczan indoksylu a układ hemostazy u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek
poddanych farmakoterapii przeciwnadciśnieniowej”**

Pan mgr farm. Tomasz Kamiński przygotował swoją rozprawę doktorską pt. „Siarczan indoksylu a układ hemostazy u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek poddanych farmakoterapii przeciwnadciśnieniowej” pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. n. med. Dariusza Pawlaka w Zakładzie Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Przewlekła choroba nerek (PChN) stanowi poważny problem zdrowia publicznego. Na podstawie niedawnej metaanalizy badań chorobowości PChN oszacowano, że choroba ta może dotyczyć 13,4% populacji światowej. PChN prowadzi do licznych ogólnoustrojowych powikłań, obejmujących m.in. choroby układu krążenia, w tym nadciśnienie tętnicze i zaburzenia zakrzepowo-zatorowe, niedokrwistość, zaburzenia gospodarki mineralnej i układu kostnego. W PChN, ze względu na postępujące upośledzenie funkcji nerek, dochodzi do nagromadzenia w organizmie toksycznych produktów przemiany materii, tzw. toksyn mocznicowych. Jedną z endogennych substancji, których stężenie zwiększa się znacząco wraz z postępem przewlekłej choroby nerek, jest siarczan indoksylu. Związek ten jest końcowym produktem metabolizmu tryptofanu pochodzącego z pożywienia. W warunkach fizjologicznych siarczan indoksylu jest skutecznie usuwany z moczem na drodze wydzielania kanalikowego; w PChN jego stężenie we krwi znacznie wzrasta. Siarczan indoksylu wykazuje dużą aktywność biologiczną, wpływając na różne komórkowe szlaki sygnałowe, nasilając stres oksydacyjny i modulując odpowiedź immunologiczno-zapalną. Uważa się, że w wyniku tych działań siarczan indoksylu wywiera m.in. działania nefrotoksyczne i uszkodzające układ krążenia.

Mimo że w tytule pracy Autor uwzględnił badania powiązań siarczanu indoksylu

z układem hemostazy u pacjentów z PChN leczonych lekami hipotensyjnymi, przedstawiony cel pracy obejmował znacznie więcej zagadnień. Wyznaczone cele pracy obejmowały dokonanie oceny zależności między stężeniem siarczanu indoksylu w osoczu a parametrami układu hemostazy, funkcji śródbłonna i morfologią krwi, wskaźnikami stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego oraz wskaźnikami biochemicznymi opisującymi funkcję nerek, a ponadto dokonanie oceny wpływu farmakoterapii przeciwnadciśnieniowej na zależności pomiędzy siarczanem indoksylu a parametrami związanymi ze stanem zapalnym, stresem oksydacyjnym, aktywacją układu immunologicznego i metabolizmem żelaza. Biorąc pod uwagę fakt, że powikłania krążeniowe PChN prowadzą do pogorszenia rokowania chorych, podjęta w pracy doktorskiej mgr. Tomasza Kamińskiego próba zbadania powiązań między siarczanem indoksylu a parametrami biochemicznymi związanymi z zaburzeniami hemostazy i układu krążenia jest w pełni uzasadniona.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana na podstawie trzech artykułów opublikowanych w latach 2017-2019, o łącznym wskaźniku oddziaływania (*impact factor*) wynoszącym 4,870 i liczbie punktów MNiSW wynoszącej 65. Rozprawa obejmuje pracę poglądową pt. "Receptor węglowodorów aromatycznych (AhR) i jego endogenne agonista – siarczan indoksylu w przewlekłej chorobie nerek" autorstwa T. Kamińskiego, M. Karbowskiej i D. Pawlaka (*Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2017: 71; 624-632) oraz dwie prace kliniczne: "Indoxyl sulfate – the uremic toxin linking hemostatic system disturbances with the prevalence of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease", autorstwa T. Kamińskiego, K. Pawlak, M. Karbowskiej, M. Myśliwca i D. Pawlaka (*BMC Nephrology*; 2017: 18; 35) i "The impact of antihypertensive pharmacotherapy on interplay between protein-bound uremic toxin (indoxyl sulfate) and markers of inflammation in patients with chronic kidney disease", autorstwa T. Kamińskiego, K. Pawlak, M. Karbowskiej, B. Znorko, A.L. Mora, M. Myśliwca i D. Pawlaka (*International Urology and Nephrology*; 2019: 1-12). Według załączonych oświadczeń współautorów prac wkład mgr. Tomasza Kamińskiego w ich przygotowanie przekraczał 75% (prace kliniczne) lub 80% (praca poglądowa). Na podstawie przedstawionej dokumentacji należy stwierdzić, że indywidualny wkład Doktoranta w przygotowanie artykułów stanowiących podstawę Jego rozprawy doktorskiej był zasadniczy.

Rozprawa doktorska mgr. Tomasza Kamińskiego została przygotowana ściśle według wytycznych Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W skład rozprawy, poza wspomnianymi publikacjami, stanowiącymi rozdziały 3-5, wchodzi trzyszyronicowy rozdział 1 -

“Wprowadzenie”, po którym krótko przedstawiony został “Cel pracy”, a także rozdział 6, zatytułowany “Dyskusja”, w którym dokonane zostało podsumowanie treści pracy poglądowej i wyników przedstawionych w pracach klinicznych (nieco ponad 2 strony). W kolejnym rozdziale przedstawionych zostało 6 wniosków. Rozprawa zawiera także streszczenie w języku polskim i angielskim (rozdział 8). Łącznie rozprawa liczy 43 strony (w tym 33 strony kopii publikacji, sformatowanych przez redakcję czasopism). Na końcu, jako kolejne rozdziały, przedstawiono “Dorobek i doświadczenie naukowe autora” oraz “Życiorys” (strony 49-56); w moim przekonaniu informacje te nie stanowią części rozprawy doktorskiej i powinny być wykazane osobno.

W artykule poglądowym wyczerpująco przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat roli siarczanu indoksyłu w PChN; praca ta stanowi bardzo dobre wprowadzenie teoretyczne do zagadnień stanowiących podstawę przeprowadzonych badań. Realizacji postawionych sobie celów badawczych Doktorant dokonał na podstawie obserwacyjnych badań klinicznych, przedstawionych w 2 publikacjach. Badania opisane w pierwszej z nich przeprowadzono u 51 pacjentów cierpiących na PChN, którzy nie byli poddawani hemodializie. Większość pacjentów była poddawana leczeniu przeciwnadciśnieniowemu. Uzyskane wyniki porównano z wynikami uzyskanymi u 18 zdrowych ochotników. Badano stężenie siarczanu indoksyłu (metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej), stężenia wybranych czynników krzepnięcia i parametrów układu fibrynolizy, wskaźników uszkodzenia śródbłonna naczyniowego, stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego (metodami immunoenzymatycznymi) oraz stężenia parametrów biochemicznych oznaczane metodami rutynowymi. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej: porównanie wyników uzyskanych u chorych z wynikami zdrowych ochotników przeprowadzono, w zależności od wyników badań normalności rozkładu, za pomocą testu *t*-Studenta lub testu Manna-Whitneya, ponadto zbadano związki między danymi (analiza współczynnika korelacji rang Spearmana, quasi-newtonowska analiza regresji, analiza regresji wielorakiej). Badania opisane w drugiej publikacji przeprowadzono u 50 pacjentów ze zdiagnozowaną PChN (leczenie zachowawcze) i nadciśnieniem tętniczym, wśród których 12 nie otrzymywało farmakoterapii przeciwnadciśnieniowej, 14 otrzymywało monoterapię (inhibitory konwertazy angiotensyny, blokery kanałów wapniowych lub leki blokujące receptory β -adrenergiczne), a 24 – złożoną terapię przeciwnadciśnieniową, oraz u 18 zdrowych ochotników. Określono stężenia biochemicznych wskaźników funkcji nerek, stanu zapalnego, statusu oksydacyjnego i selektyn E i P. Wykorzystano test *t*-Studenta lub test Manna-Whitneya do porównania wyników uzyskanych u pacjentów z PChN i zdrowych ochotników oraz analizę wariancji dla

wykazania różnic w podgrupach chorych na PChN, u których stosowano różne metody leczenia. Korelacje między zmiennymi badano za pomocą analizy współczynnika korelacji rang Spearmana.

Jakkolwiek w przedstawionych pracach udało się wykazać liczne powiązania między siarczanem indoksyłu i elementami układu hemostazy (aktywacja układu krzepnięcia, ale też nasilenie aktywności fibrynolitycznej), poziomem stresu oksydacyjnego, stopniem uszkodzenia śródbłonna naczyniowego u pacjentów z PChN, nie stwierdzono istotnego korzystnego wpływu terapii przeciwnadciśnieniowej na stężenia siarczanu indoksyłu, wskaźników stanu zapalnego, stresu oksydacyjnego, funkcji nerek i aktywność układu immunologicznego w analizowanej grupie chorych. Wykazano jednak możliwość wpływu stosowanej terapii na zależności pomiędzy siarczanem indoksyłu a niektórymi czynnikami ryzyka zwiększonej śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych u pacjentów z PChN (dysmutazą nadadtlenkową, białkiem C-reaktywnym i TNF α). Co ciekawe, i na pewno warto dalszych badań, w przypadku niektórych parametrów zaobserwowano przeciwny wpływ monoterapii i terapii złożonej na te powiązania. Rozprawę doktorską Pana mgr. Tomasza Kamińskiego podsumowuje 6 trafnych wniosków.

Chciałabym prosić o wyjaśnienie kilku zagadnień metodycznych. Nie jest dla mnie jasne, czy badania przeprowadzono w jednym, czy w dwóch niezależnych badaniach klinicznych. Czy w badaniach wzięli więc udział ci sami pacjenci i ochotnicy? Jeśli tak, to z czego wynikają drobne różnice w danych? Jak długo trwało gromadzenia materiału do badań? Jak dokonano doboru zdrowych ochotników? Czy wszystkie badania przeprowadzono jednocześnie? Jeśli nie, to które badania zostały przeprowadzone na bieżąco podczas hospitalizacji pacjentów, a które później, po zebraniu całego materiału badawczego?

Kluczowa rola Doktoranta w analizie uzyskanych wyników i opracowaniu tekstu artykułów nie ulega wątpliwości, ale nasuwa się pytanie, jaki był Jego udział w przeprowadzeniu badań stanowiących podstawę publikacji klinicznych. Czy uczestniczył w doborze pacjentów? Które badania przeprowadził osobiście?

Proszę także Doktoranta o wytłumaczenie, jak należy Jego zdaniem interpretować zróżnicowane korelacje między siarczanem indoksyłu a różnymi parametrami u pacjentów poddanych monoterapii i złożonej terapii przeciwnadciśnieniowej, które przedstawione zostały w publikacji 3.

Z obowiązku recenzenta przedstawię kilka uwag krytycznych do redakcji rozprawy:
- W spisie treści tytuł wchodzącej w skład rozprawy pracy poglądowej opublikowanej po polsku przedstawiono w języku angielskim.

- Przedstawienie wykazu skrótów ułatwiłoby lekturę rozprawy. Wprowadzenie niektórych skrótów (np. HTN dla nadciśnienia tętniczego) nie było potrzebne; w tekście polskim należy używać w miarę możliwości ze skrótów nazw polskich.
- Odnośniki literaturowe wykorzystane we *Wprowadzeniu* powinny być przedstawione w pełnej wersji (np. w przypisach), zamiast zastosowanej wersji skróconej (nazwisko pierwszego autora, czasopismo, rok).
- Chociaż wydziałowe wytyczne dotyczące przygotowania rozprawy doktorskiej na podstawie publikacji tego nie obejmują, uważam że dodatkowe skrótowe przedstawienie w osobnym rozdziale metodyki badań pozwoliłoby na uniknięcie wątpliwości dotyczących strony metodycznej pracy.
- Szkoda, że w rozdziale 5 rozprawy (publikacja 3) nie przedstawiono rycin znajdujących się w materiałach dodatkowych publikacji dostępnych na stronie internetowej czasopisma, do których odnośniki znajdują się w tekście pracy.
- Moim zdaniem rozdział "Dyskusja" zawierał raczej podsumowanie uzyskanych wyników, a tylko w niewielkim zakresie ich dyskusję. Właściwa dyskusja została przeprowadzona w publikacjach.
- Zauważyłam też kilka błędów stylistycznych (literowych), które jednak nie utrudniły znacząco zrozumienia tekstu (np. na str. 7: "Równolegle z systematycznym wzrostem kumulacji toksyn mocznicowym podczas progresji PChN...").
- W spisie publikacji stanowiących rozprawę doktorską na str. 49, nazwisko drugiej autorki pracy poglądowej przedstawiono jako "Michałowska" zamiast "Karbowska".

Mimo uwag dotyczących redakcji przedstawionej rozprawy doktorskiej, należy podkreślić, że jej podstawę stanowią trzy bardzo wartościowe prace. Praca nad publikacją poglądową nt. siarczanu indoksyłu i jego receptora doskonale przygotowała teoretycznie Doktoranta do przeprowadzenia badań dotyczących roli siarczanu indoksyłu w rozwoju zmian patologicznych w obrębie układu krążenia u pacjentów z PChN, a także do analizy uzyskanych wyników (prace kliniczne). Wyniki tych prac znacznie poszerzyły wiedzę o patogenezie zmian rozwijających się w układzie sercowo-naczyniowym pod wpływem PChN, a także dostarczyły dodatkowych danych na temat możliwości ich modyfikowania przez farmakoterapię przeciwnadciśnieniową.

Podsumowując, w moim przekonaniu rozprawa doktorska Pana mgr. Tomasza Kamińskiego wykazała Jego ogólną wiedzę teoretyczną i umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim było bliższe poznanie roli siarczanu indoksyłu w patogenezie PChN i możliwości modyfikowania

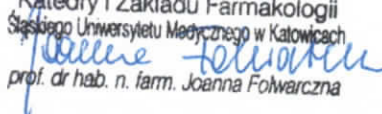
jego oddziaływania na organizm przez stosowane leki, dzięki czemu spełnione zostały warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami; tekst jednolity – Dz. U. z 27 września 2017 r., poz. 1789. Dodatkowo należy podkreślić bardzo dużą aktywność naukową Doktoranta, który oprócz rozprawy doktorskiej jest współautorem 14 publikacji o łącznym *impact factor* wynoszącym 31,094, zgłoszenia patentowego, 2 rozdziałów w podręcznikach i 17 doniesień zjazdowych.

W związku z powyższym mam zaszczyt przedstawić Panu Dziekanowi i Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

WNIOSEK

o dopuszczenie mgr. farm. Tomasza Waldemara Kamińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną pracy doktorskiej oraz spełnienie warunków *Regulaminu wyróżniania rozpraw doktorskich na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UMB*, a także znaczny dorobek naukowy mgr. farm. Tomasza Kamińskiego, **składam wniosek o rozważenie przez Radę Wydziału możliwości wyróżnienia Jego rozprawy doktorskiej.**

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Farmakologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. farm. Joanna Folwarczna