

Kraków, 20.09.2018

Ocena rozprawy doktorskiej

lek. Dominiki Klimczak-Tomaniak
pt.

„MikroRNA i chemokina CXCL12 jako biomarkery wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek”

Przewlekła choroba nerek stanowi bardzo istotny problem kliniczny. Jest to związane z tym, iż jest ona jednym z kluczowych niezależnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, a powikłania sercowo-naczyniowe stanowią główną przyczynę zgonów pacjentów z PChN. Mechanizmy tak silnego związku między PChN a schorzeniami sercowo-naczyniowymi a w szczególności rozwojem powikłań związanych z miażdżycą pozostają niejasne. Jednym z wyłaniających się czynników, których badanie zostało podjęte przez lek. D. Klimczak-Tomaniak są charakterystyczne dla PChN mechanizmy zapalne. W ostatnich latach natomiast zwraca się uwagę na fakt iż w regulacji wielu procesów patofizjologicznych w układzie sercowo-naczyniowym ważną rolę odgrywają cząsteczki mikroRNA. Mogą one również regulować zapalne mechanizmy ryzyka sercowo naczyniowego, a wykrywane w osoczu lub surowicy mogą stanowić wartościowe biomarkery. W prezentowanej rozprawie autorka podejmuje szczególnie ważny i dotychczas słabo poznany problem dotyczący zarówno mikroRNA jak i mechanizmów zapalnych ryzyka sercowo-naczyniowego w PChN, i możliwości predykcji ryzyka z zastosowaniem biomarkerów odzwierciedlających te procesy. Tak trafny dobór tematu zasługuje na szczególne podkreślenie. Ma to szczególne znaczenie w związku z faktem, iż podczas gdy mechanizmy zapalne są opisywane w miażdżycy ich rola w nadciśnieniu tętniczym i ryzyku sercowo-naczyniowym związanym z PChN jest mniej zbadana klinicznie. Duże badania kliniczne prowadzone w ostatnich latach, takie jak CANTOS pokazały, iż leczenie immunomodulujące może mieć miejsce i uzasadnienie w zapobieganiu ryzyku sercowo-naczyniowemu. Potrzebujemy jednak biomarkerów umożliwiających dobór chorych do proponowanych strategii leczenia. Ma to szczególne znaczenie w szczególnie obciążonej ryzykiem sercowo-naczyniowym grupie pacjentów z PChN gdyż klasyczne, powszechnie stosowane markery o udowodnionej przydatności, takie jak: N-końcowy fragment propeptydu

natriuretycznego typu B, czy troponina sercowa oznaczana metodą ultraczułą, gdy zastosuje się je do oceny pacjentów z PChN, są trudniejsze w interpretacji, mają mniejszą specyficzność i wymagają stosowania odrębnych punktów odcięcia. Wynika stąd potrzeba zidentyfikowania nowych, czułych i specyficznych dla konkretnego powikłania biomarkerów, które pomogą w sposób wiarygodny dokonać stratyfikacji ryzyka pacjentów, uzyskać wgląd w patofizjologię choroby i określić nowe cele terapeutyczne. Pewien postęp dokonał się już w identyfikacji biomarkerów przerostu mięśnia sercowego, który nakierował badaczy na szereg biomarkerów nowych obejmujących mikroRNA takie jak miR-7-5p, miR-26b-5p i bardziej klasyczne markery jak białko klotho.

Właśnie w ten trend ważnych pytań klinicznych wpisuje się prezentowana rozprawa doktorska. Głównym celem pracy Lek Dominiki Klimczak-Tomaniak była ocena związku pomiędzy ekspresją miR-155-5p i stężeniem chemokiny CXCL12, oznaczanymi we krwi obwodowej, a występowaniem nadciśnienia tętniczego oraz dobową zmiennością wartości ciśnienia tętniczego w grupie pacjentów z PChN. W niniejszej pracy oceniono także korelację pomiędzy stężeniem CXCL12 a LVH ocenianym w badaniu echokardiograficznym. Ponadto, na podstawie analizy danych literaturowych, podsumowano aktualną wiedzę dotyczącą roli mikroRNA w rozwoju AH oraz wstępne doniesienia o próbach terapii przeciwnadciśnieniowej z wykorzystaniem mikroRNA.

Licząca 115 stron, obszerna rozprawa ma klasyczną budowę. Składa się z wykazu trzech publikacji składających się na rozprawę doktorską, spisu treści, wykazu skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenia, celów i założeń pracy, materiału i metodyki, wyników, dyskusji, wniosków, aktualnego piśmiennictwa. Następnie zamieszczono kopie kolejnych trzech publikacji w kolejności przedstawionej w spisie. Sposób przedstawienia pracy jest czytelny i nie budzi zastrzeżeń. Pracę czyta się z przyjemnością. Na uwagę zasługuje sprawne posługiwanie się autorki terminologią specjalistyczną zarówno w kontekście aspektów molekularnych i klinicznych, choć autorce nie udało się uniknąć kilku nieścisłości językowych i terminologicznych.

Na rozprawę doktorską składa się 3 publikacje. Dwie z nich oryginalne i jedna pogładowa zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym a doktorantka jest we wszystkich pracach pierwszą autorką. Sumaryczny impact factor tych prac wynosi 7,26 a punktacja MNiSW 70 pkt – co należy uznać za satysfakcjonujące z punktu widzenia etapu rozwoju naukowego wskaźniki naukometryczne. Praca pogładowa zawarta jest w zbiorze jako ostatnia, niejako podsumowując wiedzę, choć być może lepsze jej miejsce byłoby na początku jako że została opublikowana jeszcze przed publikacjami oryginalnymi więc nie odnosi się i nie

dyskutuje oryginalnych prac autorski.

We wstępie Doktorantka opisuje najpierw zagadnienia podstawowej biologii i patogenezy ryzyka sercowo-naczyniowego i przewlekłej choroby nerek, aby następnie zagłębić się w problematykę znaczenia biomarkerów w predykcji ryzyka zarówno w populacji ogólnej jak i w populacjach szczególnie obciążonych takich jak pacjenci z PChN. W kolejnych częściach wprowadzenia doktorantka omawia dość ogólnie zagadnienia roli układu odporności w rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych przewlekłej choroby nerek ze szczególnym uwzględnieniem danych dotyczących roli chemokiny CXCL12 aby następnie omówić drugi z tematów swego zainteresowania – t.j. rolę wybranych mikroRNA w regulacji układu sercowo-naczyniowego szczególnie koncentrując się na MikroRNA-155-5p. Podczas gdy te części wstępu można uznać za czasem zawierające nadmierne uproszczenia, dobrze wprowadzają one do tematyki badań podjętych, a w szczególności odnosząc obecną wiedzę do ryzyka sercowo naczyniowego i nadciśnienia tętniczego. Wstęp wskazuje na wystarczającą wiedzę doktorantki w tym zakresie i dobrze wprowadza do przedstawienia kolejnych prac. Bardzo cenne byłoby dokładniejsze omówienie biomarkerów w PChN a nawet być może wykorzystanie narzędzi takich jak przegląd systematyczny lub metaanaliza do wnikliwej i systematycznej oceny dostępnej wiedzy do czego zachęcam doktorantkę w przyszłości.

Cele badań są przedstawione jasno, i zostały zrealizowane w toku rozprawy doktorskiej. Są one sformułowane szczegółowo, w pewnym sensie opisując również podstawowe założenia metodyczne. Głównym celem pracy była ocena dwóch potencjalnych biomarkerów: CXCL12 – chemokiny związanej z reakcją zapalną, działającej na granicy interakcji układ RAA-układ immunologiczny i miR-155-5p – cząsteczki o działaniu plejotropowym, której autorka przypisuje główną rolę w regulacji receptora AT1 dla AT II. Praca i jej cele koncentrują się na związkach z ciśnieniem tętniczym krwi. Szczegółowe cele prezentowanej rozprawy objęły: (1) ocenę korelacji pomiędzy osoczną ekspresją względną miR-155-5p a wartościami BP, ocenianymi na podstawie 24-godzinnego ABPM; (2) ocenę korelacji pomiędzy stężeniem CXCL12 w surowicy a wartościami BP, ocenianymi na podstawie 24-godzinnego ABPM, oraz LVH wyrażonym LVMI; (3) przegląd aktualnego piśmiennictwa dotyczącego roli mikroRNA w regulacji BP celem identyfikacji cząsteczek mogących odgrywać rolę biomarkerów oraz podsumowanie danych dotyczących wykorzystania mikroRNA w terapii nadciśnienia tętniczego.

Opis metodyki badań jest rzetelny i dokładny zarówno w skrótovej części podsumowującej w języku polskim jak i w poszczególnych publikacjach oryginalnych. Wskazuje na samodzielność wykonanej pracy, a także na świadomy wybór wiarygodnych i dostępnych technik badawczych. Na uwagę zasługuje bardzo dobry dobór metod klinicznych a także

świadomy wybór technik które posłużyły autorce do oceny stężeń biomarkerów. Jest to szczególnie istotne i trudne w przypadku oceny mikroRNA w osoczu i surowicy. Grupy badane i protokół badania są odpowiednio opisane w publikacjach, co wskazuje, iż autorka zdaje sobie sprawę ze znaczenia tych czynników dla interpretacji obserwowanych różnic. Zastanawia w pracach brak formalnego określenia mocy statystycznej badania co jest szczególnie ważne w obliczu sytuacji, w której w grupie kontrolnej zbadano 25 chorych a w grupie badanej 90... W ocenie mikroRNA zwraca uwagę zastosowanie dwóch wewnętrznych poziomów kontroli, zgodnie z przyjętymi standardami – U6 snRNA oraz cel-mir-39.

Poza pomniejszym pytaniem o badane populacje jakie się zrodziły podczas lektury, większość metod opisanych w Rozdziale nie budzi wątpliwości. Podsumowując, szczegółowy opis metodyczny stosowanych technik badawczych wskazuje, iż badania zarówno biomarkerów jak i kliniczne były przeprowadzone przez doktorantkę dokładnie, ze szczególnym zrozumieniem poszczególnych technik. Zarówno pomiary ciśnienia krwi, jak i echokardiografia były wykonane zgodnie z odpowiednimi zaleceniami i nie budzą wątpliwości co jest szczególnie ważne gdyż stanowią najważniejszy element ocenianych parametrów klinicznych.

Wyniki badań obejmują 2 bardzo dobrze udokumentowane rycinami i Tabelami publikacje oryginalne.

W Publikacji 1 ocenie poddano związek pomiędzy osoczną ekspresją miR-155-5p a wartościami ciśnienia tętniczego w badaniu 24 godzinnego monitorowania ciśnienia tętniczego krwi u pacjentów z PChN, w porównaniu do grupy kontrolnej złożonej ze zdrowych ochotników. Grupa pacjentów z PChN była heterogenna gdyż wśród 105 pacjentów z PChN w stadium 1-5, w 33 pacjentów było po przeszczepieniu nerki. Co ciekawe, w analizowanych w podgrupach (po wyłączeniu pacjentów dializowanych (47% badanej populacji) stwierdzono istotnie wyższą ekspresję względną miR-155-5p w osoczu w porównaniu do grupy kontrolnej. Co ważne, wśród pacjentów z CKD, w grupie 41 pacjentów (45%) z nocnym nadciśnieniem tętniczym (nocturnal hypertension, NHT) ekspresja miR-155-5p była znamiennej wyższa w porównaniu do chorych bez NHT, zachowując istotny związek ze średnim nocnym SBP w wieloczynnikowej liniowej analizie regresji. Bardzo ciekawe byłoby poznanie opinii autorki co do tego w jakim mechanizmie miR-155 może być szczególnie związany z brakiem spadku ciśnienia w nocy.

W Publikacji 2 zaobserwowano wyższe stężenie CXCL12 w surowicy pacjentów z CKD względem zdrowych osób z grupy kontrolnej. Na podstawie przeprowadzonej wieloczynnikowej liniowej analizy regresji wykazano istotną korelację pomiędzy chemokina CXCL12, wiekiem, płcią męską a przerostem lewej komory serca w echokardiografii. Co szczególnie interesujące stwierdzono istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem CXCL12 a średnimi wartościami

skurczowego ciśnienia tętniczego. Zaobserwowano odwrotną zależność pomiędzy CXCL12 a szacowanym wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej eGFR.

Do rozdziału Wyniki została zaliczona również praca pogładowa, choć brak zastosowania w niej metaanalizy i przeglądu systematycznego budzi pewne pytanie czy powinna być ona częścią wyników pracy. W publikacji tej na podstawie przeglądu dostępnych danych literaturowych z badań przedklinicznych i klinicznych, podsumowano znaczenie mikroRNA w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Przedstawiono biogenezę mikroRNA, ich mechanizm działania oraz rolę w regulacji ciśnienia, wraz ze wskazaniem możliwości potencjalnego wykorzystania miR-503 i miR-204 w leczeniu nadciśnienia płucnego co w pewnym sensie odbiega nieco od głównego nurtu badania.

Podczas gdy większość wyników jest opisana jasno, w pracach już opublikowanych w międzynarodowym piśmiennictwie a więc poddanych niezależnej recenzji, kilka aspektów wzbudziło moje dodatkowe zainteresowanie oraz szereg pytań.

Rodzi się nieco prowokacyjne pytanie, czy pacjenci z PChN, jako grupa o tak silnie zwiększonym ryzyku sercowo-naczyniowym wymagają poszukiwania biomarkerów dalszej stratyfikacji (skoro ryzyko jest już u nich tak wysokie)? W jakich innych grupach o nie aż tak zwiększonym ryzyku (wg SCORE) zaproponowane biomarkery mogłyby mieć również zastosowanie?

O ile wybór CXCL12 jest interesujący i na podstawie uzyskanych wyników jest trafny zastanawia uzasadnienie tego faktu przedstawione przez autorkę, która uznaje tę chemokinę w kilku miejscach pracy w tym w streszczeniu, jako marker aktywacji układu odporności. Nie jest to typowa definicja ani zastosowanie dla tej chemokiny. Niewątpliwie jej wybór może być uzasadniony wynikami genetycznych związków zmienności w genie kodującym tę chemokinę a ryzykiem choroby niedokrwiennej serca itp, o czym autorka także pisze.

Pisząc o cząsteczkach mikroRNA autorka używa pojęcia plejotropowego działania mir 155-5p. Warto zwrócić uwagę doktorantki że sposób działania mikroRNA czyni je z natury plejotropowymi a potencjalny efekt na ekspresję receptora AT1 który jest przez autorkę bardzo szeroko dyskutowany jest zaledwie jednym z wielu (i wcale nie najlepiej udowodnionym).

Jak wspomniałem powyżej pytanie budzi dobór liczebności grup badanych oraz wykonywanie wielu analiz w podgrupach które były analizami post-hoc. Podejście statystyczne w odniesieniu do tego problemu nie zostało opisane mimo bardzo dokładnego i prawidłowego opisu metod statystycznych.

Wnioski przedstawione są prawidłowo. Są klarowne i odpowiadają postawionym przez

Doktorantkę celom badania, w pewnych miejscach wykraczając poza postawione cele.

Dyskusja pracy w poszczególnych podrozdziałach jest przeprowadzona w sposób interesujący. Omówione zostały wszystkie główne obserwacje poczynione przez Doktorantkę, w kontekście opublikowanej literatury, analizując także potencjalne znaczenie patofizjologiczne.

Autorka cytuje 139 prac, właściwie dobierając piśmiennictwo, obejmujące najważniejsze publikacje, w tym szereg prac najnowszych. Dyskusję charakteryzuje świadoma i krytyczna analiza uzyskanych wyników oraz zasługująca na uwagę ostrożność w ich interpretacji. Uważam, że obserwacje poczynione w obecnej pracy będą stanowić cenną podstawę do przyszłych badań biomarkerów w większych populacjach oraz badań mechanistycznych.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska lek. Dominiki Klimczak-Tomaniak wskazuje na dojrzałość naukową doktorantki, zarówno w podejmowaniu tematyki i celów badań jak i w ich konsekwentnej realizacji przy pomocy starannie dobranej metodyki, a przedstawione uwagi są wyrazem zainteresowania tematem jakie we mnie lektura Rozprawy wzbudziła, i nie umniejszają jej wartości. Uważam, iż praca ta stanowi cenny wkład do światowego piśmiennictwa w tym zakresie, co ma swe odzwierciedlenie w publikacjach.

W związku z tym z całą pewnością stwierdzam, iż przekazana mi do oceny praca spełnia wszystkie wymogi rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Dominiki Klimczak-Tomaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Tomasz Guzik

Prof. dr hab. med. Tomasz Guzik

Katedra Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie