

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

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Joanny Teodozji Kamińskiej zatytułowanej
„Biomarkery chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek”

Dynamiczny rozwój chorób cywilizacyjnych takich jak cukrzyca, nadciśnienie tętnicze i otyłość oraz starzenie się społeczeństw jest powodem znaczącego wzrostu liczby chorych z przewlekłą chorobą nerek (PChN). Wyniki badań epidemiologicznych (NHANES III-USA, AusDiab-Australia, PREVEND-Holandia) wykazały, że na świecie PChN występuje u ponad 600 mln ludzi, co stanowi ok. 10-13% populacji. Badania przesiewowe przeprowadzone w Polsce (POLNEF) wskazują, że problem ten może dotyczyć ponad 4 milionów osób. Tak dynamiczny rozwój PChN powoduje, że coraz większa liczba chorych wymaga leczenia nerkozastępczego. Na koniec 2020 r. w Polsce dializowano łącznie 19647 pacjentów, z czego 18847 metodą hemodializy, a 800 chorych metodą dializy otrzewnowej. Liczba ta jest mniejsza aniżeli na koniec 2019 r., bowiem wtedy dializowano 21475 chorych, co było największą liczbą chorych dializowanych w Polsce.

PChN stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych oraz zwiększonej śmiertelności z tym związanej. Choroby układu sercowo-naczyniowego (S-N) są najczęstszą przyczyną zgonu (do 45% wszystkich zgonów) u chorych z PChN, a zwłaszcza dializowanych. Poza typowymi czynnikami rozwoju miażdżycy stwierdzanymi w populacji ogólnej, u chorych z PChN stwierdza się liczne tzw. nietypowe czynniki ryzyka, do których należą: albuminuria/białkomocz; niedokrwistość; hiperhomocysteinemia; zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej; nadczynność przytarczyc, zaburzenia elektrolitowe; niedożywienie; zapalenie ogólnoustrojowe; toksyny mocznicowe oraz kwasica metaboliczna. U chorych dializowanych obserwuje się tzw. zjawisko odwróconej epidemiologii chorób układu sercowo-naczyniowego, które polega na tym, że wśród chorych ze schyłkową niewydolnością nerek odnotowuje się zmniejszone ryzyko zgonu związane z wyższym ciśnieniem tętniczym, większym wskaźnikiem masy ciała, wyższym stężeniem cholesterolu i homocysteiny. Tłumaczy się je bardzo silnym negatywnym wpływem niedożywienia i zapalenia na śmiertelność chorych dializowanych (zespół MIA; *malnutrition, inflammation, atherosclerosis*). Uważa się, iż kluczową rolę w powstawaniu i rozwoju miażdżycy u chorych z niewydolnością nerek odgrywają reakcje związane z procesem zapalnym rozwijającym się w ścianie naczyń. Udowodniono wzrost

stężenia białka C-reaktywnego (CRP, *C-reactive protein*) u chorych z PChN, co wiąże się z niepomyślnym rokowaniem zarówno we wczesnej fazie choroby nerek, jak i w okresie schyłkowej niewydolności. Liczne badania wskazują, iż CRP jest wartościowym wskaźnikiem prognostycznym zawału serca i śmierci sercowej. Częstość występowania choroby wieńcowej wzrasta 1,5 razy przy każdym podwajaniu się stężenia CRP. Wśród cytokin prozapalnych istotne znaczenie w rozwoju objawów niepożądanych u chorych hemodializowanych mają przede wszystkim interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6), interleukina-8 (IL-8) i czynnik martwicy nowotworów (TNF-alfa, tumor necrosis factor alfa). Na udział czynników zapalnych w patogenezie miażdżycy w tej grupie chorych świadczy też podwyższone stężenie molekuł adhezyjnych, takich jak VCAM i ICAM. Podkreśla się, iż u chorych hemodializowanych z objawami choroby wieńcowej podwyższone stężenie ICAM jest niezależnym czynnikiem zgonu.

U chorych z PChN przewlekły proces zapalny może prowadzić do powstania kalcyfikacji naczyń. Zaobserwowano, że chorzy z PChN mają 2–5-krotnie bardziej nasiloną kalcyfikację naczyń wieńcowych niż równowiekowe osoby bez PChN. Jednym z najistotniejszych elementów patogenezy tego procesu są zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej i związana z nimi nadczynność przytarczyc. Stwierdzono, że nadczynność przytarczyc, zwłaszcza gdy poziom PTH przekracza 500 pg/l, jest niezależnym czynnikiem zwiększającym śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych.

Związek kalcyfikacji naczyń ze zwiększoną śmiertelnością z przyczyn S-N był jedną z przesłanek opracowania metody oceny wskaźnika uwapnienia tętnic wieńcowych (CS, *calcium score*). Wynik uzyskany podczas tomografii komputerowej umożliwia z około 85-procentową czułością i 75–85-procentową swoistością, określenie ryzyka rozwoju choroby wieńcowej, nawet u osób bez objawów klinicznych. Na podstawie tych pomiarów zaproponowano skalę służące do określenia CS. Najczęściej stosuje się skalę Agatstona, która jest pomocna w wykrywaniu osób bez objawów klinicznych choroby wieńcowej, lecz o wysokim ryzyku przyszłych zdarzeń wieńcowych, co umożliwia wdrożenie u tej grupie chorych odpowiednich działań profilaktycznych. Metoda charakteryzuje się dużą wartością predykcyjną wyniku ujemnego (bliska 100%), pozwalającą uznać CS za metodę umożliwiającą wykluczenie choroby wieńcowej. Należy zauważyć, że pośród wskazań do wykonania CS nie bierze się pod uwagę PChN.

Stwierdzając tak rozliczne przyczyny chorób układu S-N u chorych z PChN, bardzo trudno jest wskazać zakres badań diagnostycznych pozwalających na ocenę ryzyka chorób układu S-N we wczesnym stadium choroby mogących mieć zastosowanie w codziennej praktyce. Parametry stosowane w populacji ogólnej zwykle nie pozwalają na ocenę ryzyka oraz ustalenie rokowania u chorych z PChN, zwłaszcza w późnych stadiach choroby, w tym u chorych dializowanych.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, uważam, że podjęta przez Doktorantkę próba oceny biomarkerów chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek, jest godna szczególnej uwagi i poparcia. Realizacja niniejszego celu głównego pracy została oparta na realizacji poniższych celów szczegółowych:

1. Oceny ilościowej biomarkerów stanu zapalnego, kalcyfikacji naczyń i obrotu kostnego;
2. Określenia wartości prognostycznej tych biomarkerów w 5 letniej obserwacji;
3. Korelacja analizowanych biomarkerów ze stopniem zaawansowania CKD.

Temat, jak i powyższe cele rozprawy doktorskiej lek. Joanny Kamińskiej należy uznać za aktualne, interesujące i niezwykle istotne z klinicznego punktu widzenia.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja jest dziełem składającym się z trzech prac: jednej opublikowanej w czasopiśmie polskim oraz dwóch opublikowanych w języku angielskim, w czasopiśmie indeksowanych na Liście Filadelfijskiej. Pierwsza z prac, „Biomarkery uszkodzenia naczyń u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek”, została opublikowana w czasopiśmie Forum Nefrologiczne w roku 2017, natomiast dwie pozostałe są pracami oryginalnymi opublikowanymi w czasopiśmie Cytokine w roku 2019 (IF 2,952) oraz International Journal General Medicine w roku 2021 (IF 1,927)

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska „Biomarkery chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek” ma typowy dla tego rodzaju prac układ. Pierwsze strony obejmuje wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, spis treści oraz spis używanych skrótów. Następnie znajdują się streszczenia w języku polskim i angielskim zakończone przedstawieniem wniosków. Streszczenia zostały napisane w sposób zwięzły i w pełni przekazują zawarte w dysertacji treści.

Kolejną część pracy stanowi syntetycznie przedstawiony wstęp oraz rozdział zawierający założenia i cele pracy, po czym załączone zostały kopie prac będących podstawą recenzowanej rozprawy doktorskiej.

W następnych dwóch rozdziałach Doktorantka krótko omówiła opublikowane prace oraz przedstawiła wynikające z nich wnioski (rozdział: „Podsumowanie i wnioski”). Przedstawione w rozdziale VIII piśmiennictwo obejmuje 47 pozycji i odnosi się do treści zawartej w dysertacji, bowiem (co zrozumiałe) każdy z publikowanych artykułów zawiera odrębną bibliografię.

Ostatnią częścią pracy są załączniki obejmujące zgodę Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Warszawie oraz oświadczenia współautorów prac określające indywidualny wkład w powstawanie prac.

Pierwsza z załączonych prac, opublikowana w Forum Nefrologicznym, zatytułowana „Biomarkery uszkodzenia naczyń u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek”, ma charakter pracy pogłądowej i szeroko przedstawia aktualną wiedzę nt. omawianych zagadnień. Należy zaznaczyć, że jest to publikacja napisana w bardzo przystępny, przejrzysty i spójny sposób. Rycina oraz tabele w niej przedstawione czynią artykuł przejrzystym oraz są bardzo pomocne w szybkim odnajdywaniu potrzebnych informacji (w szczególności dotyczy to tabeli 3, w której zestawiono informację dotyczące biomarkerów uszkodzenia naczyń z uwzględnieniem kumulacji w PChN oraz wpływu dializ na ich usuwanie). Lektura tejże publikacji jest bardzo dobrym wstępem do zagadnień omawianych w pracach oryginalnych.

Obie prace oryginalne oparte były na badaniach wykonanych jednorazowo w tej samej grupie chorych, a następnie 5-letniej obserwacji tychże chorych. W badaniu wzięło udział 57 pacjentów, których podzielono na 2 grupy:

Grupa I: pacjenci hemodializowani ze schyłkową niewydolnością nerek (38 chorych)

Grupa II: pacjenci z PChN w stadium 3 i 4 o różnej etiologii (19 chorych)

Grupę kontrolną stanowiło 19 osób bez niewydolności nerek (jednak należy zauważyć, iż część z nich obciążona była nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą i/lub chorobą układu S-N), nie różniącą się w zakresie wieku i płci od grup badanych.

Jak wspomniano, krew została pobrana jednorazowo w celu oceny ilościowej:

a) interleukiny 6 (IL-6), czynnika martwicy guza (TNF), metaloproteinazy-9 (MMP-9), fetuiny A, adiponektyny, leptyny oraz wewnątrzkomórkowej (ICAM-1) i naczyniowej (VCAM-1), cząsteczki adhezyjnej-1 oraz klasycznych markerów biochemicznych stanu zapalnego

b) markerów obrotu kostnego: osteopontyny (OPN), osteokalcyny (OC), osteoprotegeryny (OPG) i czynnika wzrostu fibroblastów 23 (FGF23) oraz typowych parametrów oceniających gospodarkę wapniowo-fosforanową

Pacjentom, również jednorazowo, wykonano 64 rzędową tomografię komputerową serca w celu oceny wskaźnika uwapnienia naczyń wieńcowych (CS). W okresie 5 letniej obserwacji rejestrowano zgony z przyczyn sercowo-naczyniowych i ogólnych.

Według Doktorantki wyniki te zostały wydzielone do dwóch odrębnych opracowań ze względu na odrębny charakter biomarkerów biorących udział w patomechanizmach rozwoju chorób układu S-N oraz z uwagi na to, że wieloczynnikowa analiza statystyczna wykazała brak istotnego wpływu czynników opisanych w pierwszej części badań na istotność zmian obserwowanych w części drugiej. Takie wytłumaczenie przygotowania dwóch publikacji w tej samej grupie chorych jest w pełni zrozumiałe i nie budzi moich wątpliwości.

W pierwszej z oryginalnych prac zatytułowanej **"IL-6 but not TNF is linked to coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease"** oceniono wartość predykcyjną klasycznych (OB, CRP, hsCRP, prokalcytonina) i nowoczesnych markerów związanych ze stanem zapalnym (IL-6, TNF, MMP-9, fetuina A, adiponektyna, leptyna oraz ICAM-1 i VCAM-1) oraz oceny wskaźnika uwapnienia naczyń wieńcowych. W tej części badań analizie poddano też typowe parametry „kardiologiczne” (troponinę sercową T (TnT), kinazę kreatynową z jej frakcją sercową (CK-MB), N-końcowy fragment (pro)peptydu natriuretycznego typu B (NT-pro BNP). Badania te analizowano w odniesieniu do oceny ryzyka zgonu z przyczyn S-N i ogólnych w pięcioletniej obserwacji. Tradycyjne markery chorób układu S-N, takie jak cholesterol całkowity i LDL, były znacznie niższe, podczas gdy NT-proBNP i TnT były znacznie wyższe w grupie ESRD niż CKD3-4. Klasyczne, jak i „nowe” wskaźniki stanu zapalnego były również znacznie wyższe w grupie ESRD aniżeli w grupie kontrolnej. W odniesieniu do TNF i IL-6 stwierdzono również różnicę zależnie od zaawansowania niewydolności nerek (stężenia niższe w PChN stadiu 3 i 4, aniżeli u chorych hemodializowanych oraz istotna statystycznie ujemna korelacja z eGFR). Stężenie IL-6 istotnie korelowało z wartością wskaźnika uwapnienia naczyń wieńcowych i oba te parametry ponad 3-krotnie zwiększały ryzyko śmiertelności w 5-letniej obserwacji. Podobnie jak w badaniach innych autorów stwierdzono wzrost stężenia TNF, VCAM1 i ICAM1 zależny od stopnia niewydolności nerek.

Głównym wnioskiem wynikającym z przeprowadzonych analiz jest to, że IL-6 jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu z przyczyn S-N i ogólnych u pacjentów z PChN. Dodatkowa analiza statystyczna przeprowadzona przez Doktorantkę i wsp. wykazała, że zwiększenie wartości odcięcia wartości wskaźnika Agatston ze 100 do 300 jednostek, zwiększa współczynnik zagrożenia zgonem z 4-krotnego do niemal 10-krotnego (wg American Heart Association wartość CS >100 wiąże się z wysokim ryzykiem incydentu wieńcowego).

Wyniki te sugerują, że przewlekły stan zapalny i związana z nim nasilona kalcyfikacja naczyń wieńcowych mogą mieć wpływ na śmiertelność sercowo-naczyniową w tej grupie chorych. Wydaje się, że pojedynczy pomiar IL-6 i CS może być wykorzystywany w stratyfikacji ryzyka zgonu u pacjentów z CKD, zaś próg CS dla przewidywania zgonów u pacjentów z CKD powinien być wyższy niż stosowany w populacji ogólnej.

W drugiej pracy oryginalnej, zatytułowanej **„Circulating osteoprotegerin in chronic kidney disease and all-cause mortality”**, dokonano oceny wartości predykcyjnej biomarkerów obrotu kostnego takich jak: osteopontyna (OPN), osteokalcyna (OC), osteoprotegeryna (OPG) i czynnik wzrostu fibroblastów 23 wraz z klasycznymi markerami gospodarki wapniowo-fosforanowej. Autorzy zaobserwowali, że stężenie OPN, OC i OPG w surowicy jest istotnie wyższe u pacjentów z nieprawidłową funkcją nerek i białka te wykazują istotną statystycznie pozytywną wzajemną korelację

oraz negatywną z eGFR. Autorzy pracy wykazali, że OPN i OPG pozytywnie korelują ze wskaźnikiem uwapnienia naczyń. Najsilniejszy związek z wskaźnikami gospodarki wapniowej i eGFR stwierdzono w odniesieniu do OPG. Podobnie jak w przypadku IL-6 ustalono, że podwyższone stężenie OPG związane jest z większym ryzykiem śmiertelności u chorych z niewydolnością nerek (HR 4,9).

Na podstawie otrzymanych wyników badań, po rzeczowej dyskusji zaprezentowanej w obu pracach oryginalnych, Doktorantka przedstawiła jeden istotny wniosek końcowy, a mianowicie, że podwyższone stężenie IL-6 i OPG, a także wysoka wartość wskaźnika uwapnienia tętnic wieńcowych (CS) wiążą się w istotny sposób ze zwiększonym ryzykiem zgonu pacjentów z CKD.

Zakończenie swoich rozważań tylko jednym wnioskiem, świadczy o dużej wartości otrzymanych wyników, bardzo dobrze dobranych metodach statystycznych oraz dużej dojrzałości w interpretowaniu badań naukowych. Doktorantka na podstawie otrzymanych wyników badań mogła z całą pewnością przedstawić kilka wniosków, jak to zwykle czynią Doktoranci w swoich dysertacjach.

Uważam, że udowodnienie, iż pojedynczy pomiar IL-6, OPG i CS może być wykorzystywany w stratyfikacji ryzyka zgonu u pacjentów z PChN, może mieć istotne znaczenie kliniczne w codziennej praktyce. Pomimo tego, że badania te nie należą do najtańszych, wykonanie ich jednorazowo oraz wyodrębnienie grupy pacjentów wymagających szczególnej uwagi w zakresie powikłań sercowo-naczyniowych, może w konsekwencji korzystnie wpłynąć na losy pacjentów, a tym samym również spowodować ograniczenie kosztów opieki medycznej. Ciekawą wydaje się teza postawiona przez Doktorantkę, że próg CS dla przewidywania zgonów u pacjentów z CKD powinien być wyższy niż stosowany w populacji ogólnej, bowiem zwiększenie wartości wskaźnika Agatstona ze 100 do 300 powoduje wzrost ryzyka zgonu z 4-krotnego do niemal 10-krotnego. Zgodzę się, że ta teza wymaga dalszych badań i udowodnienia na większej grupie chorych.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej lekarz Joanny Kamińskiej udowadniają, że Doktorantka wykazuje się bardzo dobrą znajomością podejmowanego tematu. Metodyka prac oryginalnych była dobrana prawidłowo, a uzyskane wyniki nie budzą wątpliwości. Chciałbym zwrócić szczególną uwagę na dobór szerokiej gamy odpowiednich metod statystycznych, które pozwoliły na tak precyzyjne sformułowanie wniosku wynikającego w pełni z otrzymanych wyników.

Moje zadanie jako recenzenta rozprawy doktorskiej było znacznie ułatwione z uwagi na to, że prace wchodzące w jej skład zostały wcześniej wnikliwie ocenione przez Recenzentów powołanych przez Redakcję czasopism umieszczonych na Liście Filadelfijskiej. Ponadto większość wątpliwości i ograniczeń dotyczących prezentowanych wyników Doktorantka przedstawiła w części „Discussion” publikowanych prac. Wobec powyższego ograniczę się jedynie do drobnych uwag które nasunęły mi się w trakcie studiowania tejże rozprawy:

1. Pozycje piśmiennictwa 8-11, cytowane do zdania zawartego we wstępie pracy („Pacjenci mogą nie być świadomi choroby nerek, gdyż w początkowych stadiach CKD może przebiegać bezobjawowo”) dotyczą choroby niedokrwiennej serca/kalcyfikacji naczyń wieńcowych, a nie początkowych stadiów PChN
2. Do zdania „Przykładowo, migotanie przedsionków rozpoznaje się w tej grupie 10–20-krotnie częściej niż w populacji ogólnej” cytowana jest pozycja piśmiennictwa, która nie omawia tego problemu (Król E. i wsp „PChN – klasyfikacja, epidemiologia i diagnostyka” Forum Nefrologiczne, 2008)
3. Nie wiem dlaczego niektóre z parametrów oceniających grupę kontrolną (tabela 1 w obu pracach oryginalnych) nie były oznaczone w grupie kontrolnej (OB, PCT, HbA1C, lipidogram, proteinogram, TnT, NTproBNP) ?
4. Nie znalazłem informacji ile osób z grupy kontrolnej zmarło w okresie 5-letniej obserwacji
5. W pracy pojawiają się błędy interpunkcyjne, gramatyczne oraz redakcyjne

Wyżej wymienione uwagi, w żadnej mierze nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej przeprowadzonych badań, znaczącej pracy włożonej przez Doktorantkę (we wszystkich jest pierwszym autorem) w zaplanowanie badań, przeprowadzenie analiz, obliczeń statystycznych i przygotowanie publikacji, jak również całości rozprawy doktorskiej. Według zawartego oświadczenia wkład Doktorantki w przygotowanie publikacji był istotnie znaczący i wynosił od 55 do 75%. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą oraz dużą dojrzałością w zakresie przeprowadzania badań naukowych i analizowania uzyskanych wyników. Zaznaczyć należy, że lek. Joanna Kamińska, jest doświadczonym lekarzem praktykiem i na co dzień pracuje poza ośrodkiem akademickim, co powoduje, że prowadzenie pracy naukowej jest dodatkowo utrudnione.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa zatytułowana: „ **Biomarkery chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek**” spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.)”

Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Joanny Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wobec wysokiej wartości poznawczej rozprawy doktorskiej oraz łącznego IF składającej się na nią prac wynoszącym 4,879 proponuję wyróżnienie recenzowanej pracy.

