

Łódź, dnia 18.06.2020 r.

Recenzja pracy na stopień doktora nauk medycznych lek. Michała Małka

pt.: „Ocena wpływu niedokrwienia na stopień uszkodzenia nerki mierzony z użyciem NGAL u pacjentów poddanych organooszczędzającej resekcji guza nerki”

Nowotwory nerek stanowią nieustannie ważny problem medyczny. Postępy dotyczące diagnostyki chorób układu moczowo-płciowego sprawiły, że wykrywalność nowotworów nerki uległa znacznej poprawie, jednak nie towarzyszy jej zmniejszenie śmiertelności, której przyczyną pozostają nowotwory złośliwe tego narządu. Mimo intensywnych badań prowadzonych w ostatnim dziesięcioleciu nadal nieznaną jest etiologia większości typów nowotworów nerek.

Raki nerkowokomórkowe odpowiadają za ponad 80% przypadków wszystkich nowotworów nerek, a największa zapadalność przypada na kraje wysoko rozwinięte. Częstość występowania tego nowotworu wzrasta na całym świecie w średnim tempie 2% na rok, z wyjątkiem Danii i Szwecji, gdzie od dwóch dziesięcioleci stwierdza się spadek zachorowań.

Rak nerkowokomórkowy to najczęściej występująca patologiczna masa wykrywana w nerkach. Współczynnik zachorowalności mężczyzn do kobiet określa się obecnie na 1,5:1. Szczyt zapadalności występuje pomiędzy 60 a 70 rokiem życia. Przyczyny powstawania raka nerkowokomórkowego nie są dostatecznie poznane. Do czynników ryzyka należą: palenie tytoniu w każdej postaci, otyłość, długotrwałe stosowanie leków używanych w terapii nadciśnienia tętniczego, przewlekłe leczenie fenacetyną, ekspozycja na kadm i produkty przerobu ropy naftowej oraz kamica nerkowa. Rak nerkowokomórkowy wystąpi u około $\frac{1}{3}$ do $\frac{1}{2}$ cierpiących na chorobę von Hippel-Lindau'a. U chorych tych nowotwór pojawia się wcześniej, częściej występuje wielogniskowo lub obustronnie i częściej daje przerzuty. Niedokładnie poznana została zależność między obecnością wielotorbielowości nerek, a także gruczolaków nerek a występowaniem raka nerkowokomórkowego.

Ocenia się, że najbardziej skuteczną profilaktyką raka nerkowokomórkowego jest unikanie palenia tytoniu, jak również zapobieganie otyłości.

Rozwój i zwiększająca się dostępność badań obrazowych, takich jak ultrasonografia i tomografia komputerowa, spowodowały wzrost wykrywalności wczesnych form raka nerki. Pomimo jednak wykrywania guzów mniejszych i we wczesnych stadiach rozwoju, śmiertelność spowodowana tym nowotworem nie zmniejsza się i pozostaje w dotychczasowej zależności do częstości występowania raka.

Podstawową formą leczenia chorych na raka nerki pozostaje leczenie zabiegowe. Coraz częściej przyjmuje ono charakter małoinwazyjny, z wykorzystaniem technik laparoskopowych lub robotycznych. Doskonalenie techniki operacyjnej oraz fakt wykrywania guzów nerek we wczesnych stadiach choroby wpłynęły na coraz częstsze przeprowadzanie operacji z oszczędzeniem miększu nerki (Nephron Sparing Surgery, NSS). Uważa się, że w czasie takich zabiegów czas ciepłego niedokrwienia nerki powinien być jak najkrótszy, jednak jego bezpieczny zakres nie jest ostatecznie ustalony. Nie są także znane ani rutynowo stosowane wiarygodne markery potencjalnego uszkodzenia nerki związanego z jej niedokrwieniem w czasie operacji.

Podjęty przez autora temat badań w pracy doktorskiej polegający na **ocenie wpływu niedokrwienia na stopień uszkodzenia nerki mierzony z użyciem NGAL u pacjentów poddanych organooszczędzającej resekcji guza nerki** uważam za niezwykle interesujący i ważny dla urologii.

We wstępie swojej pracy autor przystępnie omówił problematykę leczenia organooszczędzającego guzów nerek jak również problemy związane z oceną jego bezpieczeństwa dla pacjenta.

Rozpoczynając od historii częściowej nefrektomii, Autor przejrzyste omówił wskazania do operacji nerkooszczędzającej, również z uwzględnieniem pacjentów w podeszłym wieku, a także porównał NSS z innymi metodami małoinwazyjnymi. Szczególnie dokładnie przedstawił techniki operacji nerkooszczędzającej (otwarta, laparoskopowa, z wykorzystaniem robota), a także odniósł się do problemu krwawienia śródoperacyjnego i metod jego zaopatrzenia. Rozdział ten zakończony został omówieniem powikłań po NSS oraz

metod mających zapobiegać uszkodzeniu nerki podczas takiej operacji. Umieszczone w tym rozdziale liczne ryciny pomagają czytelnikowi zrozumieć istotę problemu, a jednocześnie świadczą o własnym doświadczeniu i wiedzy Autora w odniesieniu do wielu metod leczenia organooszczędzającego.

Oceniając ogólnie pierwszy rozdział wprowadza on w sposób zrozumiały i przekrojowy w problematykę leczenia organooszczędzającego guzów nerek i uwypukla problem poszukiwania wiarygodnego markera bezpiecznego niedokrwienia nerki. Należy podkreślić, że rozdział ten opracowany został niezwykle starannie, przejrzysto i czyta się go z łatwością i przyjemnością.

W rozdziale drugim zatytułowanym: Podstawy naukowe Doktorant podejmuje problematykę szacowania ryzyka jakie niesie ze sobą ciepłe niedokrwienie nerki. Najczęściej próbuje się tego dokonać oceniając utratę funkcji narządu poprzez stężenie kreatyniny w surowicy krwi. Jak słusznie stwierdza Autor, nie jest to ocena wiarygodna, ponieważ nerki posiadają dużą rezerwę czynnościową i w związku z tym nawet duży uraz tkanki nerkowej może nie odbić się na badaniach laboratoryjnych.

Obecnie istnieje możliwość oznaczenia zmian stężeń specyficznych markerów uszkodzenia nerki, dzięki czemu pojawiła się szansa lepszej oceny wpływu operacji nerkooszczędzających na ten narząd. Wahanie stężeń substancji takich jak NGAL (neutrophil-gelatinase associated lipocalin), KIM-1 (Kidney Injury Molecule), cystatyna, interleukina 18, FABP (Fatty Acid Binding Proteins) czy NAG (N-acetylo-b-D-glukozaminidaza) w osoczu lub moczu może odpowiedzieć na pytanie, jak długi czas ciepłego niedokrwienia podczas NSS jest bezpieczny dla nerki. Do swojego projektu Doktorant wybrał substancję NGAL (lipokalina-2 lub lipokalina). Jest ona jedną z pierwszych cząsteczek wyzwalających rozwój nerek, przekształcającą zarodkowe komórki mezenchymalne w komórki nabłonkowe tworzące kanaliki i całkowite nefrony. Głównym źródłem NGAL w organizmie są leukocyty, pętla Henlego i kanaliki zbiorcze. Poziom ekspresji NGAL wydaje się być związany ze stopniem dysfunkcji nerek i może pomóc we wskazaniu chorych, u których występuje większe ryzyko szybszego pogorszenia funkcji nerek. Wykazano, że NGAL w moczu jest dobrym predyktorem uszkodzenia nerek przed wykryciem zmian w eGFR. Wykazano, że stężenie NGAL w osoczu i moczu ma moc prognostyczną dla progresji przewlekłej choroby

nerek nawet po dostosowaniu do eGFR i odzwierciedla ciężkość choroby nerek. Sugeruje się, że zwiększone stężenie NGAL może być związane z wykrywalnymi uszkodzeniami występującymi w pętli Henlego i kanalikach dystalnych.

Celem badań Autora było ustalenie wpływu zamknięcia szypuły nerkowej na uszkodzenie nerki podczas NSS, jak również ustalenie czy okres dwudziestominutowego niedokrwienia nerki jest krytyczny dla funkcji narządu. Co więcej Autor oceniał przydatność oznaczenia markera uszkodzenia nerki NGAL porównując go do stężenia kreatyniny. Na koniec Doktorant postanowił oszacować wpływ innych parametrów klinicznych na uszkodzenie nerki podczas NSS oraz ustalić korelację utraty krwi podczas operacji przeprowadzanej z niedokrwieniem i bez niedokrwienia.

Cele zostały sprecyzowane przejrzysto i pokrywają spektrum zainteresowań badaczy zajmujących się problematyką leczenia nerkooszczędzającego nowotworów nerek. Warto podkreślić, że ocena stężenia badanego markera uszkodzenia nerki NGAL w wielu punktach czasowych zarówno we krwi jak i w moczu osób operowanych było organizacyjnie trudne, a spełnienie tak postawionego celu badania wiąże się z wieloma problemami metodologicznymi i świadczy o dokładności i dociekliwości naukowej doktoranta.

Prospektywnej analizie poddano 99 kolejnych chorych operowanych organooszczędzająco z powodu guza nerki w latach 2015-2016 w Klinice Urologii CSK MSWiA w Warszawie oraz Oddziale Urologii Międzyzyleskiego Szpitala Specjalistycznego w Warszawie. Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej. U wszystkich chorych zbierano dane kliniczne takie jak wiek, płeć, średnica resekowanego guza mierzona przez patomorfologa w centymetrach, wynik histopatologiczny, utratę krwi w mililitrach mierzoną śródoperacyjnie i oznaczano stężenie kreatyniny i hemoglobiny przed i po operacji w pierwszej i kolejnych dobach. Do ostatecznej analizy włączono 52 chorych (30 mężczyzn i 22 kobiety), u których zbadano pełen profil stężenia NGAL w osoczu oraz w moczu (próbki pobierano przed zabiegiem oraz po upływie 2-, 6-, 24-, 48 godzin po zabiegu) w okresie okołoperacyjnym. Pozostali pacjenci zostali wyłączeni z analizy z powodu niekompletnych lub niediagnostycznych wyników badań laboratoryjnych spowodowanych przyczynami technicznymi na poziomie laboratorium, uszkodzeniem próbek lub obecnością krwi w próbkach moczu po operacji, co uniemożliwiało analizę. Porównano wyniki w dwóch grupach: bez niedokrwienia (n=30) i z niedokrwieniem (n=22). Spośród grupy z

niedokrwieniem wyodrębniono dwie podgrupy: z niedokrwieniem trwającym poniżej i powyżej 20 minut. Analiza statystyczna przeprowadzona została przy pomocy programu Statistica v.13.1.

Opracowując wyniki badań Autor szczegółowo analizował wzajemne zależności ocenianych parametrów. Średnia wielkość resekowanych guzów wyniosła 3,5 cm. Średnia utrata krwi w trakcie zabiegu wyniosła 200ml. Doktorant udowodnił brak wpływu zamknięcia naczyń nerkowych na wzrost NGAL i kreatyniny, a przez to na istotny wzrost stopnia uszkodzenia mięszu nerkowego. Nie stwierdził istotnych statystycznie różnic między wartościami powyższych zmiennych w grupie bez niedokrwienia i z niedokrwieniem. Jedynie rozmiar guza okazał się istotnie statystycznie większy w grupie z niedokrwieniem niż w grupie bez niedokrwienia. Wiąże się to prawdopodobnie z częstszym zaciskaniem szypuły naczyniowej u chorych z guzem nerki większych rozmiarów.

Udowodniono także brak korelacji między czasem zamknięcia naczyń nerkowych a zmiennymi analizowanymi w badaniu. Żaden współczynnik korelacji Spearmana nie okazał się istotny statystycznie (przy przyjętym poziomie istotności $p < 0,05$). Wykazano, że czas ciepłego niedokrwienia przekraczający 20 minut nie wpływa istotnie statystycznie na wzrost NGAL i kreatyniny, a więc także nie powoduje wzrostu stopnia uszkodzenia nerki w badanej grupie.

Najbardziej, wydaje się, oczekiwaną częścią wyników były te oceniające zależności stężeń NGAL w moczu i osoczu ze stężeniem kreatyniny.

Autor stwierdził słabą dodatnią korelację między kreatyniną w dobie 0 a stężeniem NGAL w moczu po 6 godzinach. Ustalił natomiast silną korelację dodatnią między kreatyniną w kolejnych dobach a stężeniem NGAL w moczu po 48 godzinach. Wszystkie wyniki NGAL z osocza nie korelowały ze stężeniem kreatyniny.

Interesujące rezultaty dotyczyły zależności pomiędzy częścią analizowanych parametrów i wiekiem pacjentów. Wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między wiekiem pacjenta a stężeniem NGAL w osoczu po 24h, a także udowodniono, że występuje umiarkowana lub wysoka korelacja ujemna między wiekiem a GFR.

Nie wykazano takich korelacji w odniesieniu do wielkości guza czy nasilenia utraty krwi.

W następnym, 6-tym rozdziale zatytułowanym: **Dyskusja**, Autor na 12 stronach odnosi się do wyników swoich badań porównując je z najnowszymi danymi z literatury tematu. Oceniając ten rozdział należy podkreślić głęboką znajomość tematyki poruszanych zagadnień. W dyskusji Autor szczegółowo i przystępnie omawia zależności pomiędzy różnymi technikami operacyjnymi zmierzającymi do bezpiecznego usunięcia guza nerki i pozostawienia czynnościowo sprawnego mięszu tego narządu. Doktorant słusznie dowodzi, że zamknięcia szypuły nerkowej nie da się wyeliminować i że jest ono nie tylko sposobem poprawy jakości operacji, ale także po prostu zwykłą koniecznością. Przejrzyste pole operacyjne po zaciśnięciu szypuły naczyniowej pozwala na bezpieczne wycięcie guza z pozostawieniem marginesu zdrowych tkanek, a także umożliwia przeprowadzenie operacji nerkooszczędzających u pacjentów z trudno położonymi guzami dużych rozmiarów. Alternatywą do takiego działania byłaby decyzja o wycięciu całej nerki.

Uzyskane przez Autora wyniki dowodzą, że operacja organooszczędzającej resekcji guza nerki przeprowadzona w ciepłym niedokrwieniu nie zwiększa istotnie ekspresji ocenianego markera uszkodzenia nerki NGAL. Wniosek ten powinien być zachętą do przeprowadzania NSS, ponieważ usuwa lub choćby zmniejsza obawę o wzrost stopnia uszkodzenia nerki w przypadku wykonania zabiegu z zastosowaniem ciepłego niedokrwienia.

W grupie operowanej z zamknięciem unaczynienia nerki, dokonano dodatkowego podziału na pacjentów operowanych z niedokrwieniem przekraczającym dwadzieścia minut. Taką czasową granicę ustalono stosunkowo dawno i może ona budzić kontrowersje. Wielu badaczy donosiło o znacznie dłuższym, bezpiecznym czasie niedokrwienia. W prezentowanym badaniu Autor postanowił więc ustosunkować się do tego parametru i udowodnić, że czas niedokrwienia dochodzący nawet do 33 minut nie zwiększa stopnia uszkodzenia nerki. Ma to, moim zdaniem, duże znaczenie praktyczne, zwłaszcza przy podejmowaniu decyzji o rodzaju proponowanego zabiegu, zwłaszcza w przypadku guzów zlokalizowanych centralnie, z większym ryzykiem krwawienia i potencjalnie dłuższym czasem potrzebnym na zeszytce otwartego układu kielichowo-miedniczkowego.

W dalszej części dyskusji Doktorant zastanawia się czy wybrany marker NGAL rzeczywiście nadaje się do oceny niedokrwienia mięszu nerkowego. Substancja ta nie jest

specyficzna dla nerki i jest uwalniana z granulocytów w przypadku schorzeń innych narządów. Dodatkowo tylko forma monomeryczna jest specyficzna dla nerki, a testy nie są w stanie różnicować form NGAL i wynik jest ich składową. Jak słusznie Autor zauważa, pacjenci poddani NSS nie mogą być w stanie ciężkim, niewydolni wielonarządowo, ponieważ tacy pacjenci są dyskwalifikowani z operacji ze względu na brak korzyści z niej wypływających. Żaden z analizowanych w rozprawie pacjentów nie wymagał leczenia w oddziale intensywnej terapii oraz żaden nie był niewydolny krążeniowo lub oddechowo. Można więc uznać, że wzrost stężenia NGAL pochodził w zdecydowanej większości z nerki, a nie z innego źródła.

Można zastanowić się, czy projekt nie mógłby być wzbogacony poprzez analizę innych potencjalnych markerów uszkodzenia nerek (np. cząsteczki KIM-1). Jak Autor tłumaczy, inne markery okazały się nieosiągalne dla badania z przyczyn finansowych oraz związanych z jeszcze większą pracochłonnością oznaczeń, a dodatkowo miały słabszą podstawę naukową.

Na koniec dyskusji Autor powraca do ciekawego, moim zdaniem, zagadnienia wpływu wieku pacjenta na ryzyko niedokrwistości pooperacyjnej. Doktorant w swoim badaniu takiej zależności nie obserwował. Prezentowane wyniki mogą więc wpłynąć na zasady kwalifikacji do operacji nerkooszczędzających pacjentów w zaawansowanym wieku.

Wyniki przeprowadzanych badań pozwoliły Autorowi uzyskać interesujący materiał naukowy, na podstawie którego zrealizował postawione cele swoich badań i wysnuł interesujące wnioski.

Recenzowana praca liczy 118 stron komputerowego maszynopisu i zawiera oprócz wstępu i celów badań, 4 rozdziały oraz wnioski, streszczenia i 149 cytowanych w pracy pozycji piśmiennictwa. Należy podkreślić, że większość pozycji piśmiennictwa omawianych w tekście pochodzi z ostatnich 10 lat. W pracy Autor zamieścił też 37 rycin i 21 tabel, które dokumentują w przejrzysty sposób szczegóły stosowanych metod i wyniki badań. Praca zawiera niewielką ilość błędów literowych i stylistycznych. Drobne błędy widoczne są m.in. w wykazie skrótów użytych w pracy np. lipokalina (zamiast: lipokalina), czy też RFT (to reaktywne formy tlenu, a dla nazwy angielskiej skrót brzmi ROS).

Do sugerowanych przeze mnie poprawek należy także ujednoczenie terminologii, zwłaszcza tej związanej z ocenianą substancją: lipokalina neutrofilowa związana z żelatyną

(w słowach kluczowych) albo lopokalina związana z żelatyną neutrofilową (w zestawieniu stosowanych skrótów).

Błędy te po części wynikają z automatycznej korekty stosowanego edytora tekstu.

Wartość merytoryczną przeprowadzonych badań oceniam bardzo wysoko. Opracowanie doktoranta jest jednym z niewielu opublikowanych w Polsce, a liczebność omawianych grup, ich jednorodność i kompletność materiału pozwala na równorzędną dyskusję z autorami zagranicznymi.

Oceniana praca lek. Michała Małka pt.: „Ocena wpływu niedokrwienia na stopień uszkodzenia nerki mierzony z użyciem NGAL u pacjentów poddanych organooszczędzającej resekcji guza nerki” jest samodzielnym dorobkiem naukowym Autora i wykazuje jego dużą ogólną wiedzę w tematach związanych z leczeniem operacyjnym chorych na raka nerki, ze szczególnym uwzględnieniem grupy małych guzów nerek. Praca dowodzi także sprawności i umiejętności w prowadzeniu badania naukowego. Uważam, że Doktorant zrealizował cele swojej pracy, a sama dysertacja odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim.

Stawiam przeto wniosek Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o jej przyjęcie i dopuszczenie lek. Michała Małka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku 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 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. Ustaw z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Dodatkowo, ze względu na znaczną wartość naukową ocenianego projektu oraz jego dużą przydatność w urologicznej praktyce klinicznej wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Dr hab.n. med. Zbigniew Jabłonowski, profesor uczelni

I Klinika Urologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

KIEROWNIK
I Kliniki Urologii
im. Wojskowej Akademii Medycznej
- Centralny Szpital Weteranów

dr hab. n. med. prof. uczelni Zbigniew Jabłonowski