

Recenzja pracy doktorskiej lek. Łukasza Jankowskiego pt.

„Rola biopsji protokolarnej w diagnostyce przeszczepu nerkowego”

Uwagi ogólne

Współczesnym zadaniem medycyny transplantacyjnej jest utrzymywanie jak najdłużej – jak najlepszej czynności przeszczepu narządowego, przy minimalnej liczbie powikłań i działań niepożądanych. W praktyce stosowanych jest wiele narzędzi w tym celu, od optymalnego doboru antygenów tkankowych (przy przeszczepianiu nerki), minimalizacji urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego, poprzez stosowanie indywidualnie dobranej, ściśle monitorowanej immunosupresji oraz zapobieganiu/opanowywaniu licznych zakażeń wirusowych i innych schorzeń towarzyszących, takich jak nadciśnienie tętnicze, zaburzenia lipidowe lub cukrzyca potransplantacyjna (przy przeszczepianiu wszystkich narządów unaczynionych). Oczywistym standardem w przypadkach pogorszenia czynności przeszczepu jest jego biopsja (wykonywana ze wskazań). Kryteria jej wykonywania są wystandaryzowane, stąd decyzja ta jest zazwyczaj prosta, o ile oczywiście nie występują doraźne przeciwwskazania, takie jak np. silna skaza krwotoczna. Inaczej jest w odniesieniu do tzw. biopsji protokolarnych, czyli wykonywanych niezależnie od czynności przeszczepu, w określonych protokołem odstępach czasowych. Klasyczny protokół (w przypadku przeszczepu nerki) to dwie kolejne biopsje wykonane po 3 i 12 miesiącach od transplantacji, ale w niektórych ośrodkach wykonuje się dodatkowo biopsje „zerowe” (w momencie przeszczepiania) oraz biopsje późne – po 2 latach od transplantacji. W niektórych badaniach klinicznych wykonywano jeszcze późniejsze biopsje protokolarne (do 3 lub 5 lat po transplantacji włącznie, w odstępach co rok), np. celem wykazania wieloletniego bezpieczeństwa immunosupresji bezsteroidowej. Obrazy patomorfologiczne, jakie można wykazać w biopsjach protokolarnych nerki to przede wszystkim tzw. zmiany marginalne, ale można też potwierdzić występowanie tzw. subklinicznego odrzucania, obecność zmian sugerujących nawrót glomerulopatii, humoralnego odrzucania, zakażenia wirusem nerkotropowym (CMV, BKV), nefrotoksyczności inhibitorów kalcyneuryny i/lub zmian

zakrzepowych w niektórych drobnych naczyniach wewnątrznerkowych. Częstość występowania poszczególnych zmian zależy od kilku czynników:

- kiedy (tj. w jakim odstępie od transplantacji) wykonano biopsję, stąd wynik może być różny w biopsji wczesnej i późnej, u tego samego chorego

- z jakiej grupy ryzyka immunologicznego pochodzi pacjent

Gdyby porównać wyniki biopsji protokolarnych wykonanych wyłącznie u chorych niskiego/średniego ryzyka z wynikami u chorych wysokiego ryzyka immunologicznego – będą zupełnie inne. Jeśli prezentowane wyniki są populacyjne (tzw. *all consecutive patients*) to ich wartości się uśrednią, bo częstość występowania poszczególnych zmian będzie tym niższa, im więcej chorych niskiego ryzyka będzie w badanej grupie. Stąd publikowane dane na temat przydatności biopsji protokolarnych w przeszczepianiu nerki są mocno rozbieżne co do częstości występowania poszczególnych patologii. Osobnym, a niemniej ważnym elementem jest to, co klinicysta zrobił po uzyskaniu wyniku takiej biopsji, zwłaszcza jeżeli zmiany są niewielkie (marginalne), a czynność przeszczepu dobra. Z kilku badań/obserwacji klinicznych wynika, że:

- im wcześniej (po transplantacji) występują jakiegokolwiek zmiany w biopsji, tym większe ma to znaczenie prognostyczne

ale

- wyniki tylko ok. 20% biopsji protokolarnych wykonywanych do pierwszego roku po transplantacji realnie wykorzystano do zmiany leczenia (w pozostałych przyjęto postawę wyczekującą, bo zmiany były niezbyt nasilone)

- w przypadku „późnych” biopsji (> 2 lat) istotnych zmian leczenia albo nie było, albo nie przyniosły one istotnego efektu w dalszej obserwacji

- w przypadku, kiedy u chorych niskiego/średniego ryzyka immunologicznego stosowana jest immunosupresja trójlekowa (TAC+MMF+Pred), trzeba wykonać średnio 10 biopsji protokolarnych, aby zidentyfikować jednego chorego z subklinicznym odrzucaniem

Z innych badań, zwłaszcza tych, gdzie w przewadze byli chorzy podwyższonego ryzyka immunologicznego, albo nerki pochodziły od zmarłych dawców o rozszerzonych kryteriach- wynika coś dokładnie odwrotnego, promującego zasadność wykonywania biopsji protokolarnych, co w tych populacjach chorych jest oczywiste.

Z tego powodu, czyli z opisanych licznych rozbieżności wynika jasno, że wybór głównego tematu pracy doktorskiej był uzasadniony i słusznie podjęty.

Rozprawa doktorska składa się z czterech publikacji, połączonych ze względu na ich treść - w merytoryczną całość. Jedna z nich (przeglądowa) ukazała w piśmie o IF 1.3.

1. Jankowski Ł, Jurczak M, Sala Z, Stepień-Dziekan J, Szarpak Ł, Durlik M. *Analysis of selected diagnostic factors of organic kidney damage revealed in protocol biopsy among renal transplant recipients*. Medical Research Journal 2024; 9(4): 323-330. (Punktacja MNiSW: 100,0)

2. Jankowski Ł, Pruc M, Gąsecka A, Szarpak Ł, Durlik M. *Biomarkers identifying deterioration of kidney graft function – usefulness of “liquid biopsy”*. Renal Disease and Transplantation Forum 2024; 17(3): 90-106. (Punktacja MNiSW: 5,0)

3. Jankowski Ł, Pruc M, Gąsecka A, Chmielewski J, Wojcik T, Szarpak Ł, Kowalczyk M. *A comprehensive review and meta-analysis of suPAR as a predictor of acute kidney injury*. Ann Agric Environ Med. 2023; 30(2): 364-368. (Punktacja MNiSW: 140,0; Impact Factor: 1,3)

4. Jankowski Ł, Stepień J, Jurczak M, Sala Z, Durlik M. *The role of protocolar biopsy in the diagnosis of kidney allograft dysfunction*. Renal Disease and Transplantation Forum 2023;16(4):127-134 DOI: 10.5603/rdatf.97029 (Punktacja MNiSW: 70,0)

Dokument rozprawy doktorskiej liczy 112 stron, zawiera (oprócz kopii wymienionych opublikowanych prac) wykaz skrótów, dwa streszczenia, wstęp, opis celów, podsumowanie i wnioski, oświadczenia współautorów prac stanowiących rozprawę, spis rycin i bibliografię (n=73).

Celem głównym pracy była ocena wartości diagnostycznej biopsji protokolarnej (w pracy oryginalnej i 2 przeglądowych) oraz ocena wybranych biomarkerów uszkodzenia nerek (wyników tzw. biopsji płynnej) w wykrywaniu subklinicznych zmian w przeszczepionej nerce (w pracy przeglądowej). Dodatkowo doktorant podjął się określenia wartości

predykcyjnej stężenia rozpuszczalnego receptora dla urokinazowego aktywatora plazminogenu (suPAR) u pacjentów z ostrym uszkodzeniem nerek (AKI) w ramach przeglądu systematycznego z meta-analizą.

Ocena pracy oryginalnej pt. *Analysis of selected diagnostic factors of organic kidney damage revealed in protocol biopsy among renal transplant recipients*. Medical Research Journal 2024;9(4): 323-330.

Praca miała charakter obserwacji retrospektywnej.

Analizą objęto 72 biorców nerki, u których wykonano łącznie 144 biopsje protokolarne w 3. i 12. miesiącu po przeszczepieniu. Nieprawidłowości histopatologiczne stwierdzono w 40% przypadków, a najczęściej występującymi zmianami były:

- subkliniczne odrzucanie komórkowe (19,4%),
- zmiany graniczne (8,3%),
- infekcja wirusem BK (5,6%)
- mikroangiopatia zakrzepowa (2,8%).

Jak pisze autor:

„w wielu przypadkach zmiany te występowały przy prawidłowych wartościach stężenia kreatyniny i eGFR, co potwierdza wartość biopsji protokolarnej w wykrywaniu subklinicznych zmian, niewidocznych w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej”.

Dalsze podane dane mówią, że:

„analiza danych klinicznych wykazała, że u pacjentów z obecnością zmian organicznych w przeszczepie stwierdzano istotnie niższe stężenia cholesterolu całkowitego ($p = 0,003$), HDL ($p = 0,015$), LDL ($p < 0,001$) oraz triglicerydów ($p = 0,044$) w porównaniu do pacjentów bez zmian histopatologicznych. W analizie korelacyjnej najsilniejszą dodatnią korelację z obecnością zmian miały niedokrwienie ($r = 0,22$), BMI ($r = 0,21$) i hipercholesterolemia ($r = 0,20$), natomiast ujemną korelację wykazano dla wartości HDL ($r = -0,33$), LDL ($r = -0,31$) oraz cholesterolu całkowitego ($r = -0,30$)”.

O ile publikacja oryginalna (autorstwa doktoranta i wsp.) nie zawiera informacji o podjętych działaniach, wynikających z analizy wyniku biopsji i ich skutkach, to niektóre z

takich danych, w mocno skróconej formie, pojawiają się na końcu rozprawy doktorskiej, w jej podsumowaniu. Wynika z nich, że:

- „w każdym przypadku stwierdzanych nieprawidłowości rozpoczynano terapię wg zaleceń (m.in. modyfikacja immunosupresji, pulsy glikokortykosteroidów, podawanie immunoglobulin; zależnie od przyczyny)”; co niezbyt dokładnie opisuje sytuację poszczególnych chorych, ani podjęte procedury terapeutyczne
- „ w badaniach biopsyjnych po 12 miesiącach stwierdzono, że u 15 z 22 omawianych pacjentów w wyniku leczenia nastąpiła normalizacja bioptatu, co świadczy o istotnych korzyściach odniesionych przez tych chorych z wykonania procedury biopsyjnej”; tu również niepodanie dokładnych danych (co i w jakiej konkretnej patologii było skuteczne) nie pozwala na rzetelną ocenę czytającego
- „u 7 pacjentów diagnoza patologii przeszczepu w obu badaniach biopsyjnych nie uległa zmianie (1 pacjent z TCMR, 2 z ABMR, po jednym chorym ze zmianami zakrzepowymi, nawrotem kłębuszkowego zapalenia w nerce przeszczepionej, zmianami granicznymi i BKV)”; komentarz jak wyżej (co nie pomogło)
- „dodatkowo w biopsji po 12 miesiącach wykryto zmiany de novo u 7 pacjentów (po 2 przypadki zmian granicznych, arteriopatii proliferacyjnej i nawrotu kłębuszkowego zapalenia nerek i jeden chory z Infekcją BKV)

Opublikowana (i zawarta w dokumentacji rozprawy) praca oryginalna nie zawiera (być może ze względu na objętościowe ograniczenia wydawnicze) kilku istotnych szczegółów, a skrócowa informacja z podsumowania także jest nadto lakoniczna, stąd istnieje potrzeba uzyskania od doktoranta w czasie obrony odpowiedzi na kilka pytań.

Pytania:

1. Proszę podać informację o zakresie ryzyka immunologicznego występującego u chorych ze zmianami w pierwszej biopsji protokolarnej i u chorych bez takich zmian.
2. Proszę podać informację, jakie konkretne patologie, stwierdzone w biopsji ulegały poprawie i pod wpływem jakiego leczenia (n=15)

3. Podobnie – jakie zmiany terapii zawiodły (n=7)
4. Należy przyjąć, że zmiany *de novo* (potwierdzone po 12 miesiącach) wystąpiły w grupie chorych uprzednio bez takich zmian, więc przeszli oni z grupy bez zmian do grupy z tzw. (oryginalne określenie użyte w tej pracy) „organic changes”. Czy analizy zależności występowania tych zmian od lipidogramu dotyczyły tylko 3 miesiąca?
5. Obecność jakiej konkretnej zmiany patomorfologicznej w biopsji była (lub powinna być) korelowana (w analizie statystycznej) z lipidogramem? W pracy (oryginalnej) opisano to „kompaktowo” (jako sumę zmian, tzw. „*organic damage*”), natomiast logiczne wydaje się ustalanie korelacji między wartościami lipidogramu, a obecności/nasileniem zmian typu wczesnej miażdżycy naczyń przeszczepu lub zmian typowych dla przewlekłej toksyczności inhibitorów kalcyneuryny, których to zmian skądinąd nie opisano w części opisowej uzyskanych obrazów patomorfologicznych.
6. Jaki mechanizm (zdaniem doktoranta) miałby powiązać hipocholesterolemię z występowaniem opisanych (zwłaszcza kompaktowo) zmian patomorfologicznych?
7. Czy istotnie niskie stężenie cholesterolu, obserwowane u chorych z obecnością zmian patologicznych w biopsjach protokolarnych nerki, były skutkiem stosowania u nich terapii statynami, czy występowały „spontanicznie”?
Klasycznie – to raczej hipercholesterolemia (czy to „spontaniczna”, czy polekowa) sprzyja rozwojowi przewlekłych zmian w tkance przeszczepu nerki, a nie odwrotnie.
8. Proszę o wyjaśnienie niespójności faktu, iż u chorych wykazujących tzw. „zmiany organiczne” w biopsjach - stężenia cholesterolu całkowitego i jego frakcji HDL - były istotnie niższe (w porównaniu do wyników u chorych bez takich zmian), natomiast wynik analizy korelacyjnej wykazał, że czynnikiem o korelacji dodatniej (z występowaniem tych zmian) była - hipercholesterolemia

Ocena publikacji przeglądowej pt.

The role of protocolar biopsy in the diagnosis of kidney allograft dysfunction. Renal Disease and Transplantation Forum 2023;16(4):127-134

Praca ta jest obszernie i wyczerpująco napisaną publikacją przeglądową (*review paper*) opisującą różnorodność danych związanych z opublikowanymi danymi na temat wartości predykcyjnych oraz praktycznego znaczenia biopsji protokolarnych nerki wykonywanych w różnych populacjach chorych i odstępach czasu. (Podobnie jak napisano we wstępie do tej recenzji pracy doktorskiej) – ta praca przeglądowa wskazuje na większe znaczenie oceny wczesnych biopsji dla wykrycia potencjalnych zmian humoralnych oraz wdrożenia odpowiedniej interwencji i znaczenia późniejszych biopsji dla wykrycia subklinicznych zmian swoistych dla zakażeń wirusowych lub IF-TA. Praca również wskazuje na wątpliwości co do bezwzględnych wskazań wykonywania biopsji protokolarnych u wszystkich chorych, bez względu na zakres ryzyka immunologicznego. Podkreślę, że gdyby ta rozprawa doktorska miała charakter klasycznej monografii, praca ta stanowiłaby bardzo dobry wstęp do przedstawienia całości problemu.

Ocena publikacji przeglądowej pt.

Biomarkers identifying deterioration of kidney graft function – usefulness of “liquid biopsy”. Renal Disease and Transplantation Forum 2024; 17(3): 90-106.

Praca ta jest obszernie i wyczerpująco napisaną publikacją przeglądową (*review paper*) opisującą znaczenie, czułość, swoistość, dostępność i znaczenie praktyczne wielu biomarkerów, jakich stężenie można mierzyć w surowicy i/lub w moczu u biorców przeszczepu nerki, celem określenia jego funkcji oraz wykrywania na wczesnym etapie rozwoju ostrego odrzucania przeszczepionej nerki. Lista opisanych szczegółowo biomarkerów jest długa i obejmuje stężenie : - kreatyniny, cystatyny C, klusteryny, CXCL9/CXCL10, *donor-derived cell-free DNA*, endokanu, ICAM-1, szeregu interleukin, KIM-1, NGAL, osteopontyny, prokacytoniny, TNF- α i micoRNA (miR:- 15a, 21,142,155). W pracy, z dobrze udokumentowanym cytowanym piśmiennictwem, opisano zalety, wady i przydatność oznaczania poszczególnych cząstek w praktyce oraz badaniach klinicznych w transplantologii. Z uwagi na przeglądowy i zamknięty do dyskusji charakter tej publikacji – nie mam uwag do tej części rozprawy doktorskiej.

Ocena publikacji przeglądowej pt. *A comprehensive review and meta-analysis of suPAR as a predictor of acute kidney injury*. Ann Agric Environ Med. 2023; 30(2): 364-368.

Praca ta jest przeglądem systematycznym z meta-analizą, której celem było określenie wartości predykcyjnej stężenia rozpuszczalnego receptora dla urokinazowego aktywatora plazminogenu (suPAR) u chorych z ostrym uszkodzeniem nerek (AKI). Postużono się klasyczną technologią, stosowaną w przeprowadzeniu meta-analizy, to znaczy wstępnie, za pomocą uprzednio zdefiniowanych słów kluczowych, dokonano przeszukania elektronicznych baz piśmienniczych takich, jak PubMed Central, EMBASE i Cochrane Database). Z ujawnionych 335 publikacji do pełnej do meta-analizy włączono 9 badań z łączną liczbą 6151 pacjentów. Analiza zbiorczych danych wykazała, że stężenie suPAR u chorych z AKI było istotnie wyższe ($5,23 \pm 4,07$ ng/mL), niż u chorych bez uszkodzenia nerek ($4,07 \pm 0,67$ ng/mL; $p < 0,001$). Potwierdzono wartość predykcyjną stężenia suPAR dla rozpoznawania AKI. Praca dostarcza także informacji o mechanizmach wiążących nadmiar suPAR z rozwojem AKI. Jest dobrze zaprojektowana i napisana.

Rozprawę doktorską podsumowują trzy wnioski (cyt):

1. „Biopsja protokolarna jest skutecznym narzędziem diagnostycznym służącym wykrywaniu subklinicznych zmian w nerce przeszczepionej. Pomimo swojej inwazyjności jest również procedurą bezpieczną, obarczoną niskim ryzykiem powikłań.
2. Rozwój nowoczesnych markerów uszkodzenia nerek sprawia, że prawdopodobna jest rezygnacja z inwazyjnych metod diagnostycznych w przeciągu kilku/kilkunastu lat. W chwili obecnej tzw. biopsję płynną i biopsje protokolarne można traktować jako metody komplementarne.
3. Szczególne korzyści z biopsji protokolarnej odnoszą chorzy z dyslipidemią. Wymagane są dalsze badania nad użytecznością markerów klinicznych takich jak suPAR, w predykcji pogorszenia funkcji nerki, także u chorych będących biorcami przeszczepu nerkowego”.

Komentarz.

Wniosek pierwszy nie budzi wątpliwości i wynika z danych własnych opisanych w pracy oryginalnej. Wniosek ten możnaby uzupełnić o dane o poprawie obrazu patomorfologicznego mięszu nerki w 12 miesięcy obserwacji w wyniku celowanych interwencji, podjętych na podstawie wyniku biopsji w 3 miesiącu po transplantacji.

Wniosek drugi jest odniesieniem do danych z pracy przeglądowej i może być uwagą/poglądem doktoranta wyrażonym w dyskusji, ale nie samodzielny wniosek wynikającym z własnej pracy. O ile wyrażony tam pogląd miałby pozostać jako wniosek numer 2 całej rozprawy – należy zaznaczyć, że jest to wynik analizy piśmiennictwa

Wniosek trzeci ma dwie składowe:

- pierwsza nie jest jasna, wobec wątpliwości co do korelacji między występowaniem konkretnych zmian patomorfologicznych, a hipocholesterolemią, a wykazanie matematycznej zależności między sumą zmian w biopsji (tj. obecności „zmian organicznych”), a niskim stężeniem cholesterolu nie uprawnia do wyrażenia twierdzenia „o szczególnych korzyściach”

- druga część (niemająca związku z pierwszą, choć obecna w jednym wniosku), dotyczy czegoś zupełnie innego, nie ma odniesienia do pierwotnego założenia pracy (oceny biopsji) i podobnie, jak wniosek drugi – może być uwagą/poglądem doktoranta wyrażonym w dyskusji, ale nie samodzielny wniosek, dodatkowo nie odnoszącym się do głównego celu pracy.

Wnioski niezależnie od powyższych uwag, nie bardzo odpowiadają kolejności i zakresowi celów szczegółowych, co wymagałoby uporządkowania

Uwagi końcowe:

Założenie główne rozprawy doktorskiej porusza aktualne zagadnienie kliniczne z zakresu transplantologii: - czy wszystkim chorym, niezależnie od wyjściowego statusu ryzyka immunologicznego warto/należy wykonywać co najmniej dwie biopsje protokolarne (po 3 i 12 miesiącach od transplantacji), a skoro tak – to co z tego wynika.

Poświęcona temu szczegółowemu zagadnieniu praca oryginalna nie zawiera pełnych szczegółowych informacji, z których część w skróconej formie pojawia się dopiero na końcu w podsumowaniu, bez danych tabelarycznych dostępnych wcześniej. Niemniej -

nadal istnieje potrzeba przedstawienia dodatkowych danych, by uzyskać wiedzę, co naprawdę uzyskano i u kogo. Dodatkowych wyjaśnień wymaga wynik analizy korelacji między występowaniem „skumulowanych” zmian w biopsji, a hipocholesterolemią.

Wydaje się, że doktorant mógłby pokusić się o napisanie (oczywiście po obronie pracy doktorskiej) – dodatkowej pracy oryginalnej, opisującej „late follow-up” chorych analizowanych dotąd tylko w perspektywie 12 miesięcy po transplantacji, z wykazaniem ich dalszych losów, w tym przede wszystkim oceny trwałości skutków podjętych na podstawie wyników biopsji interwencji farmakologicznych. Jak napisano w tej pracy (choć minimalistycznie) - uzyskano pozytywny efekt różnych interwencji farmakologicznych skutkujący poprawą patomorfologiczną u 15/22 (68,8%) chorych, przynajmniej w perspektywie 9 miesięcy (tj. między 3 i 12 miesiącem obserwacji). Z kolei u 7 chorych z „normalną” biopsją w 3 miesiącu – po 9 miesiącach rozwinęła się jakaś patologia. To ważne informacje, a dalsze ich śledzenie i opisanie bardziej uwiarygodniłoby potrzebę wykonywania biopsji protokolarnych.

Prace poglądowe, stanowiące część rozprawy oraz praca zawierająca meta-analizę są na wysokim poziomie merytorycznym i edytorskim. Ich jakość jest nienaganna, a dane są bardzo aktualne z dobrze dobranym piśmiennictwem.

Niejakie wątpliwości budzi łączenie wniosków z własnej pracy oryginalnej z wnioskami (poglądami) pochodzącymi z prac przeglądowych. O ile mają pozostać w proponowanej formule, to należy jasno podkreślić, co wynika z badań własnych, a co z danych z literatury.

Podsumowanie

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska potwierdza odpowiednią wiedzę kandydata w zakresie transplantologii klinicznej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Dodatkowo – przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi (w jednej ze swoich części) oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie medycyny transplantacyjnej.

Pomimo wyrażonych powyżej uwag krytycznych, służących wyłącznie stworzeniu możliwości podniesienia finalnej jakości tej pracy – stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarza Łukasza Jankowskiego pt.

„Rola biopsji protokolarnej w diagnostyce przeszczepu nerkowego”

spełnia jako całość - warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668), toteż zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie kandydata do dalszych etapów postępowania.

Prof. dr hab. n med. Ryszard Grenda

Warszawa.24 X.2025 r.