

WYDZIAŁ MEDYCZNY W ZABRZU,
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH
Katedra i Klinika Pediatrii
ul. 3 Maja 13/15, 41- 800 Zabrze, sekretariat - tel.(032) 3704 283 (fax. 292)
e-pocztą: pedzab@sum.edu.pl
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Ziara
Recenzent: Prof. dr hab. n. med. Maria Szczepańska

Zabrze, 04.11.2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. med. Konstancji Fornalczyk

”Osteopontyna, płytkowy czynnik wzrostu (PDGF-BB) i morfogenetyczne białko kości (BMP-7) jako wskaźniki zagrożenia rozwoju miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek u dzieci ”

Zgodnie z uchwałą Nr 956/IX/2019 Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu przedstawioną w piśmie z dnia 24.09.2019 roku o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy, mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości celu badawczego
2. poprawności metodycznej
3. redakcji przedłożonej pracy
4. znaczenia klinicznego i praktycznego wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

1. Wartość celu badawczego

W badaniach epidemiologicznych występowanie schyłkowej niewydolności nerek zostało oszacowane na 65 przypadków na 1 milion dzieci poniżej 20 roku życia można więc ją zaliczyć do chorób rzadkich. Choroba ta ma jednak poważne następstwa. Mimo znacznego postępu nauk medycznych rozpoznanie przewlekłej choroby nerek (PChN) wiąże się z niepomysłnym rokowaniem u dzieci i powoduje znaczne skrócenie ich czasu życia nawet o kilkadziesiąt lat w stosunku do populacji rówieśników.

We wstępie poza definicją, klasyfikacją i etiopatogenezą PChN Doktorantka w sposób dokładny opisała kryteria rozpoznania choroby oraz kryteria zaawansowania PChN. Wskazała sposób szacowania przesączania kłębuszkowego (eGFR) – normy, wzory do obliczeń, przedstawiła szczegółowo zaburzenia metaboliczne i objawy występujące w przewlekłej chorobie nerek. Podkreśliła, że w miarę postępu choroby dochodzi do nagromadzenia się toksyn mocznicowych i dekompensacji mechanizmów regulujących i w konsekwencji do wystąpienia objawów klinicznych związanych z zaburzeniami metabolizmu aminokwasów, węglowodanów i lipidów. Przewlekły stan zapalny, nieprawidłowości gospodarki wapniowo-fosforanowej, niedokrwistość, zaburzenia krzepnięcia i odporności, nadciśnienie tętnicze prowadzą do uszkodzenia niemal wszystkich układów i narządów w stadium schyłkowym PChN.

Kolejny akapit został poświęcony charakterystyce występowania miażdżycy u dzieci ze szczególnym uwzględnieniem populacji dzieci z PChN, w której powikłania sercowo-naczyniowe stanowią główną przyczynę zgonów, a ryzyko ich wystąpienia jest znacząco większe niż w populacji ogólnej również w przypadku dzieci. Doktorantka omówiła również klasyczne i nowe czynniki odgrywające rolę w procesie aterogenezy. Podkreśliła rolę występowania zaburzeń metabolizmu wapnia, fosforu i wtórnej nadczynności przytarczyc w kalcyfikacji naczyń u dzieci z PChN, wymieniła czynniki promujące i zwalniające zwapnienie naczyń oraz typy kalcyfikacji.

Z uznaniem należy więc odnotować, że **lek. Konstancja Fornalczyk** podjęła się opracowania, ważnego z klinicznego punktu widzenia, zagadnienia jakim jest ocena osoczowych stężeń osteopontyny, płytkowego czynnika wzrostu-BB (PDGF-BB) oraz morfogenetycznego białka kostnego-7 (BMP-7) u dzieci z PChN leczonych zachowawczo i nerkozastępczo (hemodializa, dializa otrzewnowa) oraz ich związku z innymi czynnikami ryzyka rozwoju miażdżycy i tworzenia się zwapnień naczyniowych

W dalszej części wstępu **lek. Konstancja Fornalczyk** przedstawiła zagadnienia związane z oznaczanymi markerami: ich strukturę, lokalizację tkankową, mechanizm powstawania oraz rolę w stanach fizjologii i patologii. Doktorantka scharakteryzowała szczegółowo, co zasługuje na uwagę, rolę BMP-7 i podkreśliła, że białko to jest istotnym czynnikiem w embriogenezie nerek warunkującym ich prawidłowe wykształcenie oraz odgrywa protekcyjną rolę w procesie śródmiąższowego zapalenia i włóknienia nerek.

Z tego i dalszych fragmentów Rozprawy wynika niezbicie, że Doktorantka jest bardzo dobrze zaznajomiona z przedmiotem wykonywanych badań, zna i rozumie istotę zaburzeń.

Lek. Konstancja Fornalczyk podała szczegółowe cele pracy w 4 podpunktach, które są sformułowane jasno i objęły następujące zagadnienia:

- 1). Czy u dzieci z PChN dochodzi do zmian osoczowych stężeń OPN, PDGF- BB oraz BMP-7 w porównaniu z grupą kontrolną i czy zmiany te nasilają się wraz z progresją przewlekłej choroby nerek ?
- 2). Czy rodzaj terapii nerkozastępczej i czas jej trwania mają wpływ na stężenia badanych białek ?
3. Czy i jak zmieniają się stężenia badanych białek w osoczu pacjentów leczonych hemodializami po pojedynczej sesji hemodializy ?
- 4/ Czy istnieje zależność pomiędzy osteopontyną, PDGF-BB oraz BMP-7 a wybranymi parametrami gospodarki wapniowo- fosforanowej i lipidowej ?

Należy szczególnie podkreślić, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania łącznie z badaniami pilotażowymi są pierwszymi, wykonanymi w takim zakresie w dziedzinie nefrologii dziecięcej w Polsce. W aktualnym piśmiennictwie dostępne są tylko nieliczne badania na temat roli jaką odgrywają wyżej wymienione białka w patogenezie miażdżycy i kalcyfikacji naczyniowej u chorych dorosłych z PChN, a ich wyniki nie są jednoznaczne.

2. Poprawność metodyczna

2.1 Materiał i metody

Doktorantka objęła badaniami 69 dzieci z PChN (37 chłopców i 32 dziewczynki). Przyczyną przewlekłej choroby nerek były: wrodzone wady nerek i układu moczowego - u 52,2%, przewlekłe glomerulopatie - u 18,8%, torbielowatość nerek -u 11,6 % dzieci, pęcherz neurogeny - u 7,2%, zespół hemolityczno mocznicowy - u 2,9 %, sepsa -u 1,4%, przyczyny nieznanne - u 5,79 % dzieci. Pacjenci zostali podzieleni na trzy grupy w zależności od stadium PChN i zastosowanego leczenia nerkozastępczego. Grupę kontrolą stanowiło 23 zdrowych dzieci (13 chłopców, 10 dziewczynek) diagnozowanych z powodu moczenia nocnego.

U każdego dziecka oznaczono osoczowe stężenie OPN, BMP-7 oraz PDGF- BB metodą ELISA. U pacjentów hemodializowanych badania wykonywano dwukrotnie, przed i po zakończeniu zabiegu. Ponadto u wszystkich oznaczono surowicze stężenia: mocznika, kreatyniny, cholesterolu całkowitego, cholesterolu-LDL, cholesterolu-HDL oraz trójglicerydów, wapnia, fosforanów. Obliczono także iloczyn wapniowo- fosforanowy oraz eGFR według oryginalnego wzoru Schwartz. U pacjentów z PChN oznaczono również stężenie parathormonu, hemoglobiny i hematokryt.

Przeprowadzono adekwatną analizę statystyczną.

2.2 Wyniki

Wyniki zostały przedstawione w sposób bardzo szczegółowy. Uzyskane dane i porównania wybranych parametrów udokumentowano w 26 dobrze dopracowanych graficznie tabelach oraz 12 kolorowych rycinach.

Doktorantka w swojej Rozprawie wykazała, że:

- 1). We wszystkich trzech grupach dzieci z PChN stwierdzono istotnie wyższe wartości osoczowych stężeń OPN i białka BMP- 7, a znacząco niższe - PDGF- BB w porównaniu do grupy kontrolnej.
- 2). Stężenia OPN były najwyższe, a PDGF-BB najniższe u dzieci hemodializowanych i różniły się istotnie od obserwowanych w grupie leczonych zachowawczo. Nie wykazano różnic w stężeniach obu tych białek pomiędzy obu grupami leczonymi nerkozastępczo.
- 4). Stężenia BMP- 7 nie różniły się znamienne w porównaniu wyodrębnionych grup dzieci z PChN.
- 5). Wykazano, że po pojedynczym zabiegu hemodializy dochodziło do istotnego obniżenia osoczowego stężenia OPN oraz do wzrostu stężenia PDGF-BB, podczas gdy wartości stężeń BMP- 7 pozostawały stabilne.
- 6). Badania dotyczące wzajemnych powiązań pomiędzy badanymi białkami wykazały jedynie dodatnią korelację OPN z BMP-7 oraz BMP-7 z PDGF-BB w grupie PChN leczonych zachowawczo.
- 7). Analiza zależności pomiędzy wybranymi parametrami gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz lipidowej a badanymi markerami kalcyfikacji wykazały:
 - w grupie dzieci z PChN leczonych zachowawczo stężenia OPN i BMP-7 korelowały dodatkowo ze stężeniem kreatyniny, a ujemnie ze stężeniem wapnia w surowicy, a ponadto stężenie BMP-7 ze stężeniem fosforanów w surowicy oraz wartością iloczynu wapniowo-fosforanowego.
 - w grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo stwierdzono dodatnią korelację stężenia BMP-7 ze stężeniem kreatyniny oraz stężenia PDGF-BB ze stężeniem trójglicerydów.
 - w grupie hemodializowanych dzieci wykazano dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem BMP-7 a stężeniem mocznika i fosforanów oraz stężenia PDGF-BB z wartością iloczynu wapniowo-fosforanowego i stężeniem LDL.

3. Redakcja przedłożonej pracy

Rozprawę rozpoczyna spis treści str. 3-5; następnie typowy układ: wstęp: str. 6-40; cel pracy: str. 41-42; opis grupy pacjentów i metodyka badań: str. 43-48; wyniki: str. 49-77; omówienie wyników: str. 78-92; wnioski: str. 93; spis tabel i spis rycin: str. 115-118; spis

skrótów: str. 119-124; streszczenie w języku polskim: str. 125-129; streszczenie w języku angielskim: str. 130-133. Piśmiennictwo na stronach 94-114 jest ułożone w porządku alfabetycznym, bez kolejnych numerów. W większości obejmuje literaturę anglojęzyczną; zawiera 42 publikacje od roku 2014, co wymagało od Doktorantki znacznego nakładu pracy w zebraniu odpowiedniej literatury. W pozycji: Berenson GS: Bogalusa Heart Study Investigators – niekompletny jest rok opublikowania doniesienia. Trzeba zwrócić uwagę na pisownię holenderskiego nazwiska Bonthuis M, która jest kobietą.

Praca napisana jest poprawną polszczyzną, dobrze się ją czyta.

W tabelach brakuje jednostek, w których są wyrażane stężenia badań biochemicznych oraz eGFR, brak wyjaśnienia skrótu FZ. W tabelach korelacji pomiędzy badanymi markerami i parametrami biochemicznymi w grupie PChN w ostatnim wierszu ponownie umieszczony jest wiek – najpewniej dotyczy to innego parametru.

W/w uwagi dotyczące redakcji nie umniejszają w żaden sposób wysokiej wartości merytorycznej Rozprawy.

Jeżeli chodzi o szatę graficzną wyróżnić należy sposób wykonania rycin.

4. Wartość kliniczna i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz

W dyskusji **lek. Konstancja Fornalczyk** konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki w odniesieniu do danych z piśmiennictwa polskiego i światowego. Doktorantka podkreśla, że akceleracja miażdżycy u dzieci z PChN jest wynikiem nakładania się, względnie rzadszych niż u dorosłych, tradycyjnych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy oraz czynników związanych ściśle z toksemią mocznicową. Doktorantka wymienia wśród nich m.in.: przewlekły proces zapalny, stres oksydacyjny, dysfunkcję śródbłonka naczyniowego, niedokrwistość oraz zaburzenia gospodarki wapniowo- fosforanowej. Wskazuje ponadto, że środowisko mocznicowe nasila oddziaływanie tradycyjnych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy, w tym przede wszystkim zaburzeń gospodarki lipidowej.

Wyniki badań własnych Doktorantki wskazują, że u wszystkich dzieci z PChN występowały wyższe wartości stężeń cholesterolu całkowitego, cholesterolu-LDL oraz trójglicerydów, z wartościami maksymalnymi w grupie hemodializowanych. Nie wykazywały one różnic w zależności od stopnia PChN i rodzaju leczenia nerkozastępczego. Wartości stężeń cholesterolu-HDL były najniższe w grupie dzieci przewlekłe hemodializowanych w porównaniu do innych grup. Doktorantka zaznacza, że w świetle nowszych doniesień cholesterol-HDL u dzieci z PChN traci swą wazoprotekcyjną funkcję ponieważ jest silnym inhibitorem syntazy tlenku azotu i promotorem produkcji wolnych rodników tlenowych przez komórki śródbłonka.

Zgodnie z wynikami badań Doktorantki zostały potwierdzone głębokie zanurzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej u dzieci z PChN z najniższymi stężeniami wapnia u dzieci hemodializowanych i najwyższymi wartościami iloczynu wapniowo-fosforanowego u dzieci dializowanych otrzewnowo.

Ważnym osiągnięciem jest udokumentowanie, że stężenie OPN było najwyższe u dzieci hemodializowanych przed zabiegiem hemodializy i po sesji dializacyjnej ulegało znamienemu obniżeniu. Wg Doktorantki ta grupa dzieci z PChN jest więc narażona na okresowe wahania stężenia OPN, a w związku z tym potencjalnie jest najbardziej zagrożona rozwojem ognisk kalcyfikacji naczyniowej. Dodatkowo Doktorantka omówiła fakt, że defosforylacja cząsteczki OPN w rejonie treoninowym w przebiegu PChN, pozbawia ją właściwości antykalcyfikacyjnych.

Biorąc pod uwagę udział OPN w reakcjach zapalnych, nie można także wykluczyć, że wysokie wartości tego białka u dzieci przewlekle leczonych dializami mogą być wyrazem nasilenia przewlekłego procesu zapalnego, który towarzyszy PChN.

W odniesieniu do BMP-7 Doktorantka wskazuje, że brak jest doniesień dotyczących stężeń BMP-7 w surowicy u dzieci z PChN co utrudniało dyskusję uzyskanych własnych wyników. Sugeruje, że warto zwrócić uwagę na rolę BMP-7 w procesie wapnienia pozaszkieletowego i prób doświadczalnych jego hamowania na wczesnych etapach zmian oraz obserwowanego związku w/w białka z ryzykiem zgonu dializowanych pacjentów.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki sugerują, że osoczowe stężenia PDGF-BB u dzieci z PChN leczonych zachowawczo i nerkozastępczo, istotnie niższe w porównaniu do wartości stwierdzonych u pacjentów z grupy kontrolnej z najniższymi wartościami stężeń PDGF-BB u chorych przewlekle hemodializowanych nie mają związku ze stężeniami BMP-7 i OPN i wskaźnikami gospodarki wapniowo-fosforanowej. Doktorantka zakładała istnienie takich zależności.

Ciekawą obserwacją z praktycznego punktu widzenia, co Doktorantka podkreśla, jest fakt, że u dzieci z PChN wzrost osoczowych stężeń OPN oraz BMP-7 postrzeganych w aspekcie inhibitorów kalcyfikacji wraz z obniżeniem stężenia PDGF-BB, który nasila zwapnienia, mogą odzwierciedlać uruchomienie mechanizmów obronnych związanych z miażdżycą i kalcyfikacją naczyniową.

Uzyskane w Rozprawie wyniki zachęcają do wykonywania badań prospektywnie – np. w odstępach rocznych – jako, że natura zaburzeń wydaje się być bardziej złożona, za czym przemawia brak oczekiwanych, wzajemnych zależności pomiędzy badanymi białkami oraz pomiędzy nimi a wskaźnikami gospodarki wapniowo-fosforanowej i lipidowej.

Lek. Konstancja Fornalczyk zwraca krytycznie uwagę, że na uzyskane przez nią wyniki mogą mieć wpływ ograniczenia pracy wynikające z braku badań obrazowych dokumentujących zwapnienia pozaszkieletowe oraz względnie mała liczebność badanej grupy uniemożliwiająca zgromadzenie większej ilości dzieci co jest bolączką opracowań pediatrycznych.

Zachęcam gorąco Doktorantkę do kontynuacji badań z rozszerzeniem grupy pacjentów co podniosłoby walory przyszłych publikacji.

Sformułowanych 5 wniosków stanowi w pełni odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze.

WNIOSEK KOŃCOWY

Biorąc pod uwagę nowoczesność, wartość merytoryczną pracy, istotny aspekt kliniczny i praktyczny oraz przeprowadzenie rzeczowej dyskusji oceniam Rozprawę jako spełniającą wymagania stawiane rozprawom na **stopień doktora nauk medycznych** określone w art. 13, ust. 1, Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz. 882 z późn. zm.).

Mam więc zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie **lek. Konstancji Fornalczyk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę innowacyjny charakter badań oraz duży wkład pracy Doktorantki włożony w opracowanie rozprawy doktorskiej, mam zaszczyt wnioskować o przyznanie pracy wyróżnienia.

Prof. dr hab. n. med. Maria Szczepańska

6354679 Prof. dr hab. n. med.
Maria Szczepańska
specjalista pediatra, nefrolog
nefrolog dziecięcy