

WYDZIAŁ NAUK MEDYCZNYCH 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, 30.06.2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. med. Leopolda Radosława Rehana

"Związek pomiędzy przewlekłą chorobą nerek a aktywnością sirtuiny 1 w limfocytach krwi obwodowej"

Zgodnie z uchwałą Nr 1009/09/2019 Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu przedstawioną w piśmie z dnia 30.09.2019 roku o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy, pragnę 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

Mimo znacznego postępu nauk medycznych rozpoznanie przewlekłej choroby nerek (PChN) wiąże się z niepomyślnym rokowaniem u dzieci i dorosłych i powoduje znaczne skrócenie ich czasu życia, w przypadku dzieci nawet o kilkadziesiąt lat w stosunku do populacji rówieśników. Choroba ta ma poważne następstwa dla wszystkich tkanek i narządów.

We wstępie poza definicją i klasyfikacją PChN Doktorant w sposób dokładny opisał kryteria rozpoznania choroby oraz kryteria zaawansowania PChN zgodnie z najnowszymi wytycznymi. Kolejny akapit poświęcił omówieniu wybranych zagadnień klinicznych PChN w populacji dziecięcej. Wskazał, że kluczową różnicą w porównaniu do populacji dorosłych jest

etiologia PChN, która u dzieci w 50% wynika z istniejących wrodzonych wad nerek i układu moczowego, w następnej kolejności – dziedzicznych nefropatii i kłębuszkowego zapalenia nerek. Do czynników ryzyka PChN u dzieci należą również wcześniactwo, niska masa urodzeniowa i otyłość.

Lek. Leopold Rehan nawiązał także do zależności PChN i stanu zapalnego zarówno o charakterze systemowym jak i lokalnym w obszarze miąższu nerek. Kolejne rozważania dotyczą celów terapeutycznych w PChN z pierwszorzędowym – zapobieganiem progresji choroby do stadium schyłkowego. Obszerny fragment wstępu został poświęcony ogólnym zagadnieniom związanym ze stanem zapalnym, z przedstawieniem objawów stanu zapalnego oraz jego mechanizmów i klasyfikacji.

Z uznaniem należy odnotować, że **lek. Leopold Rehan** podjął się opracowania, ważnego z klinicznego punktu widzenia, zagadnienia jakim jest ocena stężenia i aktywności sirtuiny 1w limfocytach krwi obwodowej u dzieci z PChN leczonych zachowawczo i nerkozastępczo w zależności od stopnia zaawansowania PChN.

W dalszej części wstępu **lek. Leopold Rehan** przedstawił zagadnienia związane z oznaczanym markerem: strukturę sirtuiny 1, lokalizację tkankową, mechanizm działania oraz rolę sirtuin w stanach fizjologii i patologii. Doktorant scharakteryzował szczegółowo, co zasługuje na uwagę, rolę sirtuiny 1 w stanie zapalnym oraz w metabolizmie komórek miąższu nerek z uwzględnieniem zmniejszenia nasilenia apoptozy oraz włóknienia i działaniem hipotensyjnym.

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

Lek. Leopold Rehan podał szczegółowe cele pracy w 3 podpunktach, które są sformułowane jasno i obejmują następujące zagadnienia:

1. Jakie jest stężenie i aktywność sirtuiny 1 w limfocytach krwi obwodowej u dzieci w zależności od stopnia zaawansowania PChN?
2. Czy istnieją zależności pomiędzy wybranymi markerami stanu zapalnego a zaawansowaniem PChN i stężeniem oraz aktywnością sirtuiny1?
3. Czy sirtuina 1 może być pomocna w opracowaniu strategii terapeutycznych dla przewlekłej choroby nerek?

Należy szczególnie podkreślić, że przeprowadzone przez Doktoranta badania są pierwszymi, wykonanymi w tym temacie i zakresie w dziedzinie nefrologii dziecięcej w Polsce. W aktualnym piśmiennictwie dostępne są tylko nieliczne badania na temat roli jaką odgrywa sirtuina 1 w progresji PChN. Dotyczą one populacji osób dorosłych.

2. Poprawność metodyczna

2.1 Materiał i metody

Doktorant objął badaniami 40 dzieci z PChN (22 chłopców i 18 dziewcząt). Pacjenci zostali podzieleni na trzy grupy w zależności od stadium PChN. Grupę 3. stanowiły dzieci leczone nerkozastępczo. Nie są wymienione w Rozprawie przyczyny, które doprowadziły do uszkodzenia nerek w grupie badanej. Grupę kontrolną stanowiło 35 zdrowych dzieci (21 chłopców, 14 dziewcząt) z prawidłową funkcją nerek.

U każdego dziecka oznaczono stężenie sodu, potasu, kreatyniny, mocznika, białka C-reaktywnego, liczbę leukocytów i limfocytów we krwi obwodowej, stężenie i aktywność sirtuiny1.

Przeprowadzono adekwatną analizę statystyczną.

2.2 Wyniki

Wyniki zostały przedstawione w sposób dość szczegółowy. Uzyskane dane i porównania wybranych parametrów udokumentowano w 5 tabelach, 17 wykresach, z których pierwszych 5 jest słabo czytelnych.

Doktorant w swojej Rozprawie wykazał, że:

- 1) Istotnie statystycznie różnice pomiędzy grupami dzieci z PChN i dziećmi zdrowymi wystąpiły jedynie dla stężenia kreatyniny i eGFR, co wynika z definicji PChN
- 2) Zachodzi stopniowy wzrost średniej liczby leukocytów i limfocytów wraz z progresją PChN u dzieci,
- 3) Nie ma istotnych różnic w stężeniu i aktywności SIRT1 w limfocytach krwi obwodowej pomiędzy grupą badaną a kontrolną oraz pomiędzy poszczególnymi grupami PChN.
- 4) W całości analizowanej populacji pediatrycznej nie obserwuje się korelacji pomiędzy stężeniem lub aktywnością SIRT1 w limfocytach krwi obwodowej a liczbą leukocytów lub limfocytów, stężeniem CRP w surowicy, stężeniem kreatyniny w surowicy lub eGFR.
- 5) W grupie dzieci z PChN obserwuje się ujemną korelację pomiędzy GFR a stężeniem SIRT1, jednak bez zależności pomiędzy stężeniem kreatyniny a stężeniem SIRT1.

Występuje dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem CRP a aktywnością SIRT1.

Istnieje ujemna korelacja pomiędzy liczbą leukocytów i limfocytów a eGFR, jednak bez podobnej zależności dla stężenia kreatyniny

3. Redakcja przedłożonej pracy

Rozprawę rozpoczyna wykaz skrótów: str. 3-5; spis treści: str. 6-7; następnie typowy układ: wstęp: str. 8-31; cel pracy: str. 32; materiał i metody: str. 33-37; analiza statystyczna: str. 38; wyniki: str. 39-45; dyskusja: str. 46-54; wnioski: str. 55; streszczenie w języku polskim: str. 56-59; streszczenie w języku angielskim: str. 60-62; spis tabel, wykresów i rycin: str. 63-64. Piśmiennictwo na stronach 65-73 jest ułożone w porządku alfabetycznym, bez kolejnych numerów. W większości obejmuje literaturę anglojęzyczną; zawiera 33 publikacje od roku 2015, co wymagało od Doktoranta nakładu pracy w zebraniu odpowiedniej literatury.

Praca napisana jest w większości poprawną polszczyzną, dość dobrze się ją czyta.

W wykazie skrótów brakuje tłumaczeń kilkunastu skrótów na język polski.

W tabeli drugiej określenie „albuminuria ciężko zwiększona” wymaga korekty podobnie jak i określenie „i pozostałe ssacze sirtuiny” na str. 24. Opisy do ryciny 5 wymagają poprawy. Rysunki a w zasadzie ryciny powinny być wykonane w języku polskim jak całość Rozprawy. W/w uwagi dotyczące redakcji nie umniejszają w żaden sposób wartości merytorycznej Rozprawy.

4. Wartość kliniczna i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz

W dyskusji **lek. Leopold Rehan** konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki w odniesieniu do danych z piśmiennictwa polskiego i światowego. Doktorant podkreśla, że u chorych z PChN nakładają się 3 czynniki ryzyka utraty zdrowia i życia: niedożywienie, stan zapalny i miażdżyca. Doktorant wziął pod uwagę szczególnie rolę zapalenia jako czynnika progresji PChN. W moim odczuciu należałoby jednak równolegle zwrócić uwagę na znaczenie niedożywienia u dzieci, co mogłaby wykazać analiza parametrów antropometrycznych w badanej grupie.

Doktorant zaznacza, że w świetle nowszych doniesień wzrost aktywności SIRT1 w komórkach wiąże się z supresją reakcji zapalnej a wyższe stężenia tej deacetylazy powodują szybsze wygaszanie reakcji zapalnej w doświadczalnych modelach sepsy.

Doktorant wskazuje, że u dzieci z PChN po stopniowym wzroście aktywności i stężenia SIRT1 w stadiach zachowawczych, dochodzi do obniżenia CRP w schyłkowym stadium choroby. I jak dodaje „obserwujemy wprawdzie wówczas obniżenie aktywności enzymu, ale jego stężenia praktycznie nie ulegają zmianie”. Z obowiązku recenzenta należy przypomnieć, że w analizie danych dla wykazania różnicy konieczne jest uzyskanie istotności statystycznej. Zgodnie z wynikami badań Doktoranta, zostało potwierdzone, że wśród pacjentów z PChN, zanotowano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy eGFR a liczbą limfocytów i całkowitą pulą leukocytów we krwi obwodowej. Jednocześnie w badanej populacji

stwierdzono ujemną korelację pomiędzy wiekiem a liczbą leukocytów i limfocytów, co jest typowe dla zmian tych parametrów wraz z rozwojem osobniczym. Wobec powyższego być może zwiększona liczba leukocytów i limfocytów w grupie dzieci dializowanych wynika z ich młodszego wieku.

Dodatkowo Doktorant omówił fakt, że w dostępnej literaturze doniesienia na temat związku pomiędzy liczbą leukocytów, limfocytów lub CRP a stężeniem kreatyniny lub eGFR u pacjentów z PChN nie prezentują jednoznacznego obrazu a dodatkowo obserwacje pediatryczne są nieliczne, co znacznie utrudnia dyskusję uzyskanych wyników własnych.

Lek. Leopold Rehan zauważa, że dostępne w literaturze prace, dotyczące populacji dorosłych, sugerują powiązanie stężeń oraz aktywności SIRT1 ze stężeniami kreatyniny i/lub stopniem zaawansowania PChN. Zgodnie z tymi doniesieniami wzrostowi stężenia kreatyniny i obniżeniu eGFR towarzyszy zmniejszenie ekspresji SIRT1. Autorzy ci postulowali, że u osobników pozbawionych ekspresji SIRT1 występują odmienne mechanizmy adaptacyjne. W badaniach eksperymentalnych u myszy z nieaktywną postacią SIRT1 i niewydolnością nerek, nie dochodziło ani do kompensacyjnego przerostu nefronów ani do wzrostu wartości GFR dla pojedynczego nefronu.

Doktorant dyskutując, że poszukując związku między stężeniem lub aktywnością SIRT1 a parametrami funkcji nerek, w materiale własnym, zaobserwował ujemną korelację pomiędzy stężeniem SIRT1 w limfocytach krwi obwodowej a eGFR, co odbiegało od wyników uzyskanych u chorych dorosłych. Ten tok rozumowania w Jego opinii wspiera potwierdzona w badaniu własnym, dodatnia korelacja pomiędzy aktywnością SIRT1 w limfocytach krwi obwodowej a wiekiem młodych pacjentów.

Dodatnia korelacja pomiędzy aktywnością SIRT1 w limfocytach krwi obwodowej a wiekiem występowała zarówno, gdy analizowano całość populacji pediatrycznej (grupa badana i kontrolna) jak i odrębnie w podgrupach. Większość dostępnych publikacji naukowych postuluje zmniejszenie ekspresji SIRT1 wraz z wiekiem, rozpoczynające się po okresie dojrzewania i wiążące się z tym wystąpienie powikłań - nasilenie procesu zapalnego czy chorób degeneracyjnych.

Doniesienia z literatury wskazują dodatkowo, że masa ciała badanych ludzi miała istotny wpływ na stężenie SIRT1 i czas rozpoczęcia dojrzewania (ze znacząco niższymi stężeniami SIRT1 u osobników otyłych, co wiązało się z wcześniejszym dojrzewaniem). Interesującym spostrzeżeniem wynikającym z przeprowadzonego badania jest stały wzrost ekspresji SIRT1 wraz z wiekiem aż do okresu dojrzewania.

Lek Leopold Rehan postawił pytanie - czy SIRT1 może być potencjalnym celem terapeutycznym współdecydującym o spowolnieniu rozwoju PChN? Ze względu na brak jednoznacznych wyników badań w dostępnej literaturze, ich niedostateczną jakość (głównie badania obserwacyjne) a także uwzględniając powyższe wyniki, Doktorant skonkludował, że przedwczesne jest udzielenie jednoznacznej odpowiedzi.

Uzyskane w Rozprawie wyniki zachęcają do wykonywania badań prospektywnie w odstępach rocznych – jako, że natura zaburzeń wydaje się być bardziej złożona, za czym przemawia brak oczekiwanych wzajemnych zależności pomiędzy SIRT1 a wskaźnikami stanu zapalnego. A może istotne byłoby poddanie analizie dodatkowych markerów zapalenia.

Lek. Leopold Rehan zwraca krytycznie uwagę, że na uzyskane przez niego wyniki mogą mieć wpływ ograniczenia pracy wynikające z względnie małej liczebności badanej grupy co jest bolączką opracowań pediatrycznych.

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

Sformułowane 4 wnioski stanowią odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze. Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę, że wniosek nr 2 powinien być wyrażony z mniejszą „siłą”, ponieważ opiera się wyłącznie na stwierdzanej korelacji a nie różnicach wynikających z bezpośredniego porównania.

WNIOSEK KOŃCOWY

Biorąc pod uwagę nowoczesność, wartość merytoryczną pracy, istotny aspekt kliniczny oraz przeprowadzenie wyważonej 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. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

Pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie **lek. Leopold Rehana** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Maria Szczepańska

