

Prof. dr hab. med. Roman Danielewicz

Zakład Pielęgniarstwa Chirurgicznego, Transplantacyjnego i Leczenia Pozaustrojowego

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Ul. Nowogrodzka 59 (pawilon 11D1), 02-006 Warszawa

RECENZJA

Pracy lekarki Agnieszki Lepieszy

pt. Wpływ prekondycjonowania nerki przez odległe niedokrwienie na jej czynność po przeszczepieniu

na stopień doktora nauk medycznych

z Kliniki Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Promotor: Prof. dr hab. med. Artur Pupka

Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Kościelska-Kasprzak

Przeszczepienie nerek jest najczęstszym na świecie rodzajem przeszczepienia. Doskonałe wyniki leczenia przeszczepieniem tego narządu pod względem jakości życia po przeszczepieniu oraz ze znacznie dłuższym przeżyciem biorców w porównaniu z innymi sposobami leczenia nerkozastępczego (t.j. dializami) spowodowało, że jest to preferowany sposób leczenia chorych ze schyłkową niewydolnością nerek. Wobec zwiększającej się liczby osób z niewydolnością nerek (co wynika m.in. z chorób cywilizacyjnych jak cukrzyca czy nadciśnienie tętnicze), liczba osób oczekujących na przeszczepienie nerki jest we wszystkich krajach większa, niż liczba narządów dostępnych do przeszczepienia. Powoduje to stałe poszukiwanie sposobów na zwiększenie liczby dostępnych narządów (np. rozszerzanie kryteriów kwalifikacji narządów do przeszczepienia) oraz sposobów poprawy jakości przeszczepów, poprzez ograniczenie czynników prowadzących do ich uszkodzenia w okresie pobierania, przechowywania i reperfuzji. W świetle powyższych stwierdzeń uważam wybór tematu pracy, za bardzo trafny i mający niezwykle ważny aspekt naukowy i praktyczny.

Doktorantka realizowała swoją pracę doktorską w latach 2012-2017 w Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu – w Klinice Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej i Transplantacyjnej (gdzie nerki były pobierane i przeszczepiane) i w Poradni Transplantacji Nerek Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej, pod której opieką znajdowali się biorcy przeszczepów w okresie trzyletniej obserwacji. Te współpracujące ze sobą jednostki stanowią jeden z najbardziej doświadczonych w tej dziedzinie ośrodków w Polsce.

Rozprawa lekarz Agnieszki Lepieszy ma układ typowy. Praca ma 110 stron maszynopisu, w tym ostatnie 23 strony to wykaz 31 tabel, 3-ch rycin i bibliografia złożona z 205 pozycji piśmiennictwa. Autorka posługuje się bardzo poprawną polszczyzną a praca pod względem edytorskim i graficznym jest przygotowana niezwykle starannie, z użyciem przejrzystych i czytelnych tabel i rycin.

Wstęp zawiera wprowadzenie do tematyki pracy i dane epidemiologiczne ilustrujące zawarte przez recenzenta na wstępie informacje dotyczące potrzeb w zakresie przeszczepiania nerek. Autorka omawia także przyczyny opóźnionej czynności nerek po przeszczepieniu i mechanizmy uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego. Na podstawie starannie dobranych pozycji piśmiennictwa Doktorantka omawia zjawisko prekondycjonowania (tzw. hartowania) tkanek poprzez niedokrwienie, co jest przedmiotem pracy. Zjawisko to opisane na modelu zwierzęcym przez Murry i wsp w 1986 roku, było wykorzystywane w późniejszych latach w kardiochirurgii czy chirurgii naczyniowej. Cytowani w pracy badacze wykazywali ochronny wpływ prekondycjonowania przez niedokrwienie (ang. *ischemic preconditioning*, IPC) w dwu modelach – lokalnym (LIPC) i odległym (RIPC). Zjawisko to ma złożony mechanizm działania – humoralny, nerwowy i systemowy, jednak jego ochronne działanie na narząd poddany tej procedurze oraz na narządy odległe (serce, nerki, wątrobę) nie zawsze są jednoznaczne i wystarczająco wyjaśnione. W medycynie transplantacyjnej IPC było także badane, jednak nie znalazło jak dotychczas stałego zastosowania.

Istotną część wstępu, stanowiącego jednocześnie omówienie piśmiennictwa Doktorantka poświęciła powszechnie stosowanym markerom czynności i uszkodzenia nerek przeszczepionych (stężenie kreatyniny i mocznika w surowicy) oraz markerom mniej poznanym (potencjalnym) jak klasteryna, interleukina 18 i lipokalina związana z żelatynazą neutrofilów (NGAL). W świetle dostępnych publikacji Autorka wyczerpująco opisuje te biomarkery uszkodzenia nerek, ich szlaki metaboliczne i potencjał jako wskaźników uszkodzenia przeszczepu w okresie niedokrwienia i reperfuzji.

Wstęp, przygotowany w oparciu o dobrze dobrane pozycje piśmiennictwa, stanowi solidny opis zjawisk zachodzących w nerce pobranej do przeszczepienia, w okresie jej niedokrwienia i reperfuzji, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska RIPC oraz markerów uszkodzenia przeszczepu. Całość wstępu wskazuje na rozwagę Autora w doborze literatury i umiejętność analizowania pozyskanych informacji.

Ten przegląd pozwolił Autorce na sformułowanie hipotezy badawczej, która zakładała, że zdalne hartowanie przez niedokrwienie (RIPC) zmniejsza zakres uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego przeszczepianych nerek. Do oceny tego uszkodzenia Autorka zdecydowała się wykorzystać wyżej wskazane nowe markery – klasterynę, interleukinę 18 i lipokalinę (NGAL). Oprócz hipotezy badawczej sformułowano cztery **cele badawcze (str. 28)**.

W rozdziale **Materiał i metody** Doktorantka opisuje w sposób klarowny plan badania, kryteria włączenia pacjentów do badania, technikę procedury RIPC zastosowanej w grupie badanej, przebieg badania, dokonywane oznaczenia, czas obserwacji (do 3 roku po przeszczepieniu) i punkty końcowe badania. Projekt badawczy uzyskał pozytywną zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (KB-290/2017). Do obliczeń statystycznych zastosowano starannie wybrane, zaawansowane testy dostępne w pakiecie Statistica v.13 (StatSoft Polska Sp. z o.o.) oraz MedCalc (MedCalc Software Ltd, Belgia) przy założeniu istotności statystycznej, przy $p < 0,05$ (m.in. test Shapiro-Wilka, Manna-Whitneya, test kolejności par Wilcoxon, test rangowy ANOVA Friedmana czy korelacja R Spearmana).

Do badania włączono 44 zmarłych dawców, u których stwierdzono śmierć na podstawie kryteriów neurologicznych (DBD), od których pobrano i przeszczepiono w ośrodku własnym 86 nerek. Doktorantka podaje dane demograficzne dawców, ich parametry hemodynamiczne, czynność nerek przed pobraniem narządów, choroby współistniejące, zastosowane aminy presyjne, czas pobytu w OIT i parametry biochemiczne, parametr Kidney Donor Risk Index (KDRI) i inne dane. Do grupy badanej, u której zastosowano protokół RIPC zakwalifikowano 17 dawców a do grupy kontrolnej 27 dawców, kwalifikacja do grup była losowa. Nie stwierdzono pomiędzy tymi grupami istotnych statystycznie różnic w badanych parametrach poza większą częstością pobrań wielonarządowych w grupie kontrolnej ($P=0,008$).

Procedura RIPC wykonywana w grupie badanej polegała na zamykaniu zaciskiem naczyniowym wypreparowanej uprzednio tętnicy biodrowej wspólnej na okres 5-ciu minut w dwu cyklach z 5-cio minutową reperfuzją kończyny. Po zakończeniu RIPC pobierano próbki krwi i moczu od dawcy w celu oznaczenia markerów niedokrwienia. Oznaczanie tych parametrów wykonywane było także u biorców przeszczepów po 6, 12 i 24 godzinach od reperfuzji. Narządy pobierane były w sposób typowy i przeszczepione po okresie przechowywania w płynie UW 86 biorcom. Przeprowadzono analizę biorców w obu grupach pod względem danych demograficznych, przyczyn niewydolności nerek, rodzaju dializ i czasu ich trwania, statusu immunologicznego (PRA, liczby niezgodnych antygenów HLA), współczynnika KDRI i czasu

niedokrwienia przeszczepu oraz wyników badań po przeszczepieniu (kreatynina, e-GFR, diureza dobową), jak również wystąpienie punktów końcowych badania tj. opóźnionej czynności przeszczepu (DGF), wystąpienie epizodu ostrego odrzucania (AR), utrata czynności przeszczepu i zgon biorcy w 3-letnim okresie obserwacji. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami biorców poza czasem ciepłego niedokrwienia (WIT=0, częściej w grupie kontrolnej), diurezą dobową (większa w grupie kontrolnej) i odsetkiem dawców o rozszerzonych kryteriach (większa w grupie RIPC). Na podkreślenie zasługuje relatywnie długi okres obserwacji badanych pacjentów po przeszczepieniu – począwszy od pierwszych dób aż po 3-ci rok od przeszczepienia w dziewięciu punktach czasowych.

W rozdziale **wyniki** Doktorantka przedstawia w sposób przejrzysty na 24 stronach uzyskane dane, interpretuje je i ilustruje w postaci tabel i wykresów statystycznych. Stwierdzono, że przeżycie przeszczepów w grupie RIPC wynoszące 95% w 1, 2 i 3 roku obserwacji nie różniło się istotnie od gry kontrolnej (odpowiednio 94%, 83% i 79%). Analizując parametry dawcy i biorcy w grupie kontrolnej Autorka stwierdziła istotny wpływ wieku dawcy na czynność przeszczepu powyżej 1 miesiąca, istotny wpływ KDRI (gorsza czynność przeszczepu związana z wyższą wartością parametru), korelację gorszej czynności przeszczepu z epizodem naczyniowo-mózgowym (CVA) jako przyczyną zgonu dawcy oraz zakwalifikowaniem dawcy jako dawcy o rozszerzonych kryteriach (ECD).

Podobne wyniki stwierdzono w grupie RIPC za wyjątkiem CVA jako przyczyną zgonu u dawcy, co w grupie RIPC nie miało wpływu na czynność przeszczepu. Nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami co do częstości punktów końcowych w postaci AR, AR+DGF czy zgonu z czynnym przeszczepem, natomiast w grupie RIPC stwierdzono istotnie częstsze występowanie opóźnionej czynności przeszczepu DGF (34,4% vs 13%). Oceniając wpływ procedury RIPC na czynność przeszczepu, Autorka nie stwierdziła wpływu tej procedury na wyniki analizując je z uwzględnieniem pochodzenia nerki od dawców ECD jak i dawców standardowych.

Oceniając uzyskane wyniki stężeń biomarkerów w surowicy i moczu dawcy stwierdzono ich korelację ze stężeniem kreatyniny i ujemną korelację z e-GFR dawcy. W populacjach ECD i dawca standardowy różnicę stwierdzono jedynie w stężeniu NGAL w moczu dawców ECD (wyższe wartości). Co interesujące, procedura RIPC nie wpłynęła na stężenia markerów w surowicy i moczu dawcy, jednak stwierdzono istotny wpływ tej procedury na występowanie opóźnionej czynności przeszczepu (tab. 22). Porównując stężenia markerów surowicy dawcy z czynnością nerki przeszczepionej (e-GFR) stwierdzono korelację stężenia IL-18 w 3 i 6 miesiącu po

przeszczepieniu. Oznaczenia markerów w moczu dawcy korelowały z czynnością przeszczepu jedynie w odniesieniu do markera NGAL.

Oznaczenia markerów w surowicy biorców wykazały ich istotne zmniejszanie się w czasie pierwszej doby po przeszczepieniu. Porównanie wyników oznaczeń markerów w grupach biorców z opóźnioną czynnością nerki i bezpośrednią czynnością wykazało wyższe stężenia NGAL w surowicy i moczu, wyższe stężenia klasteryny w moczu i wyższe stężenia IL-18 w surowicy i moczu. U biorców z czynnością bezpośrednią następowało szybkie obniżanie się IL-18 w surowicy i moczu, klasteryny w moczu i NGAL w surowicy i moczu (tę korelację potwierdziła analiza ROC dla tych parametrów).

W przeprowadzonej **dyskusji** Doktorantka rzeczowo i dojrzałe analizuje swoje wyniki w zestawieniu z danymi z innych ośrodków, już na wstępie wskazując, że charakterystyka dawców i biorców zakwalifikowanych do badania nie różni się od populacji biorców i dawców, których wskazuje w danych ogólnopolskich Poltransplant. Autorka potrafi krytycznie ocenić dane innych ośrodków (np. Eurotransplantu), które mogą różnić się od parametrów w Polsce (np. dłuższy okres zimnego niedokrwienia w Polsce wynikający z innej alokacji i dystrybucji narządów). W podrozdziale dyskusji dotyczącym procedury RIPC (rozdz. 6.2 str. 67) Doktorantka wskazuje na inne badania z zastosowaniem RIPC, które są w literaturze pojedyncze, zwłaszcza zastosowane w sposób przyjęty w recenzowanej pracy. Inni autorzy wykazali w dwu przypadkach niepełne wyniki badania, w jednej pracy wykazano większą częstość DGF w grupie po RIPC ale także lepsze przeżycie przeszczepu (podobnie jak w recenzowanej pracy). Dalej Doktorantka analizuje uzyskane rezultaty z danymi z literatury w zakresie wpływu RIPC na wyniki przeszczepienia (gdzie dane są skąpe), wpływ cech klinicznych dawcy na czynność nerki przeszczepionej oraz oznaczenia markerów jako wykładników jakości nerek pobranych do przeszczepienia i ich zastosowanie w przewidywaniu czynności narządu po transplantacji.

Autorka umiejętnie dobiera literaturę i ocenia własne wyniki, porównując je z danymi innych autorów. Interpretacja uzyskanych wyników, dobór argumentów i krytyczna ich ocena w zestawieniu z danymi z literatury świadczy o dojrzałości Agnieszki Lepieszy jako badacza.

W podsumowaniu Doktorantka przedstawia 4-ry właściwie sformułowane **wnioski**, wynikające z analizowanego materiału, które korespondują z postawionymi pracy celami. Wyniki przeprowadzonej w materiale procedury RIPC wprawdzie nie potwierdziły w pełni hipotezy badawczej (zmniejszenie częstości DGF), jednak miało korzystny wpływ na przeżycie odległe przeszczepów. Potwierdzono przydatność zastosowanych markerów do oceny czynności nerek po

przeszczepieniu. **Piśmiennictwo** składa się z 205 pozycji pochodzących z recenzowanych czasopism anglojęzycznych. Prace te pochodzą w przeważającej ilości z lat 2000-2010 (37%), 2011-2020 (47%), z 2021 r. 6,7% i do 1999 r. włącznie - 9,7%.

Pracę lekarz Agnieszki Lepieszy oceniam wysoko. Dowodzi ona dojrzałości Autorki, umiejętności zaplanowania badania, właściwego doboru literatury i jej krytycznego wykorzystania do analizy i dyskusji uzyskanych wyników oraz umiejętności wyciągania rzeczowych wniosków.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednak przedstawić następujące uwagi:

- Doktorantka wskazała wprawdzie, że dobór biorców i dawców do grupy kontrolnej i badanej był losowy, jednak brak szczegółów tego doboru. Być może wynikiem nieprzewidzianych czynników jest to, że w grupie badanej znaleźli się dawcy o „lepszej” charakterystyce (więcej pobrań wielonarządowych w tej grupie, mniej dawców o rozszerzonych kryteriach). Budzi to pewną wątpliwość co do pełnej porównywalności grup w zakresie wybranych parametrów;
- na stronie 33 Doktorantka stwierdza, że „kwalifikacja pacjentów do zastosowania chłodzenia odbywała się wyłącznie według preferencji operującego chirurga i dostępności oprzyrządowania do chłodzenia”. Nie opisano stosowanego w ośrodku Autorki sposobu chłodzenia nerki w czasie zespożeń naczyniowych (częściej stosowanego w grupie kontrolnej), co jak wykazano m.in. w ośrodku recenzenta ma wpływ na zmniejszenie ryzyka opóźnionej czynności. Recenzent rozumie trudności młodego badacza w wyegzekwowaniu protokołu badania od chirurgów (będących pod presją osiągnięcia dobrego wyniku operacji i biorących za nią odpowiedzialność), jednak w aspekcie zaprojektowania badania klinicznego pozostaje tu pewna wątpliwość, co do standaryzacji postępowania, co może mieć wpływ na czynność nerki przeszczepionej.

Poczynione przeze mnie uwagi w niczym nie umniejszają wspomnianej wcześniej **wysoce pozytywnej oceny pracy i wkładu Doktorantki**. Praca ta jest oryginalnym osiągnięciem Autorki, została dobrze zaplanowana i przeprowadzona obejmując długi okres starannego monitorowania biorców w okresie odległym od przeszczepienia. **Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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.).**

Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medycze Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lekarz Agnieszki Lepieszy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. med. Roman Danielewicz
Zakład Pielęgniarstwa Chirurgicznego,
Transplantacyjnego i Leczenia Pozaustrojowego
Wydział Nauk o Zdrowiu
Warszawski Uniwersytet Medyczny

6

Wojciech 23.12.2021.