



Dr hab. Beata Hukowska-Szematowicz, prof. US

Instytut Biologii
Uniwersytet Szczeciński
ul. Felczaka 3c
71-412 Szczecin
e-mail: beata.hukowska-szematowicz@usz.edu.pl

Szczecin 25.05.2023r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Rogulskiej

pt.: *„Wybrane biomarkery diagnostyczne u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerek”*

Promotor rozprawy: prof. dr hab. n. med. Danuta Kosik-Bogacka

Promotor pomocniczy: dr hab. n. zdr. Iwona Wojciechowska-Koszko

Recenzja została wykonana na zlecenie Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne

Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

reprezentowanej przez Przewodniczącą dr hab. n. med. Edytę Paczkowską

1. Ogólna charakterystyka pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Rogulskiej liczy 209 stron i podzielona jest na części, klasyczne dla opracowań na stopień naukowy: wykaz skrótów (3 str.); (1) wstęp (28 str.); (2) hipotezy i cele badawcze (2 str.); (3) materiał i metody (13 str.); (4) wyniki (63 str.); (5) dyskusja (26 str.); (6) podsumowanie i wnioski (1 str.); piśmiennictwo (28 str.); wykaz tabel (5 str.); wykaz rycin (2 str.); streszczenie (2 str.); summary-streszczenie w języku angielskim (2 str.); załączniki 1-3 (32 str.). Rozprawa napisana jest poprawną polszczyzną, ilustrowana licznymi rycinami i tabelami. Koncepcja pracy jest bardzo interesująca, szczegółowo przemyślana i zrealizowana.

Biomarker to wskaźnik biologiczny, mierzony zwykle w krótkim czasie. Biomarkery mogą być stosowane w badaniach przesiewowych, diagnostyce, charakterystyce i monitorowaniu chorób; jako wskaźniki prognostyczne; do opracowywania zindywidualizowanych interwencji terapeutycznych; do przewidywania i leczenia niepożądanych reakcji na leki; do identyfikacji typów komórek oraz do badań farmakodynamicznych. Dobre biomarkery powinny być mierzalne z niewielką lub żadną zmiennością oraz powinny zmieniać się szybko i niezawodnie w odpowiedzi na zmiany stanu. Stwierdzono, że idealny biomarker, który może być wykorzystywany w diagnostyce chorób nerek powinien spełniać szereg kryteriów, min. wykazywać wysoką czułość i swoistość narządową, korelować z obrazem histopatologicznym, wykrywać wczesne zmiany uszkodzenia nerek, pobieranie materiału do badań powinno być nieinwazyjne dla pacjenta, a testy wykorzystywane do badań powinny być ogólnodostępne, tanie i szybkie.

Aktualnie pośrednia ocena uszkodzenia nerek u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerki oparta jest głównie na ocenie wartości klasycznych parametrów laboratoryjnych (stężenia w surowicy elektrolitów, mocznika, kreatyniny z oszacowaniem współczynnika filtracji kłębuszkowej, badania ogólnego moczu) i jest niewystarczająca. Dlatego badania należy poszerzyć o nowe parametry, w tym biomarkery białkowe. Ponadto aktualnie w postępowaniu diagnostycznym brak jest biomarkerów odzwierciedlających zwłaszcza wczesną fazę uszkodzenia nerek. W związku z tym temat podjęty przez Panią mgr Karolinę Rogulską uważam za niezwykle aktualny, interesujący i bardzo ważny z punktu widzenia postępowania diagnostycznego i klinicznego.

Rozprawa doktorska dotyczy oceny ośmiu białek, które mogą pełnić funkcję biomarkera odzwierciedlającego czynności nerek i posłużyć do diagnostyki uszkodzenia nerek u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerki. Nowe biomarkery białkowe pozwolą na wcześniejsze i pewniejsze rozpoznanie uszkodzenia nerek, co umożliwi szybkie wdrożenie odpowiedniego leczenia. Oznaczanie w surowicy i moczu biomarkerów białkowych może stać się z czasem rutynowym postępowaniem diagnostycznym u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerki. Do oceny wybrano osiem białek: (1) lipokalinę związaną z żelatynazą neutrofilów (NGAL)-ulegającą ekspresji w min. w komórkach nerek; (2) cząsteczkę-1 uszkodzenia nerek (KIM-1)-ulegającą ekspresji min. w nerkach; (3) chemokinę 10 z motywem C-X-C (CXCL-10)- wydzielaną min. z komórek układu immunologicznego, komórek nabłonka, śródbłonka; (4) osteopontynę (OPN)- ulegającą ekspresji min. w nerkach i komórkach układu odpornościowego; (5) cystatynę C (Cys C)-produkowana przez komórki jądrzaste; (6) białko wiążące retinol 4 (RBP-4)-syntetyzowane w wątrobie i przez adipocyty; (7) jelitowy czynnik trefoilowy 3 (TFF3)- wydzielany przez komórki śluzowe jelita cienkiego; (8) klusterynę (CLU)- występująca min. w nerkach. Białka te oznaczono w surowicy i moczu w układzie dynamicznym tj. w pierwszym dniu, po pół roku i rok po przeszczepie nerki. Do oznaczenia ich posłużono się dwoma czułymi metodami badawczymi tj. metodą xMap Luminex oraz metodą ELISA. Oba badania potwierdzają wysoki poziom uzyskanych wyników i świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu warsztatu badawczego jak i merytorycznego Pani mgr Karoliny Rogulskiej. Spośród ośmiu w/w białek największy potencjał biomarkera wykazało pięć z nich: lipokalina związana z żelatynazą neutrofilów (NGAL); cząsteczka-1 uszkodzenia nerek (KIM-1), cystatyna C (Cys C), chemokina 10 z motywem C-X-C (CXCL-10) i jelitowy czynnik trefoilowy 3 (TFF3).

2. Ocena merytoryczna

Wstęp

Praca rozpoczyna się obszernym 28-stronicowym wstępem. Struktura tego rozdziału jest bardzo czytelna, merytoryczna i dobrze skonstruowana. Ciężar merytoryczny odpowiedni do zawartości pracy. Informacje zaprezentowane we wstępie bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w temat pracy i podkreślają wagę podjętego tematu i są istotne dla poprawnej analizy przedstawionych wyników badań. Autorka w pierwszej kolejności omawia mechanizmy odrzucenia przeszczepionej nerki i typy odrzutu. Następnie bardzo płynnie omawia osiem białek, które mogą być wykorzystane jako biomarkery odzwierciedlające czynności nerek: (1) lipokalina związana z żelatynazą neutrofilów (NGAL), (2) cząsteczka-1 uszkodzenia nerek (KIM-1), (3) chemokina 10 z motywem C-X-C (CXCL-10), (4) osteopontyna (OPN), (5) cystatyna C (Cys C), (6) białko wiążące retinol 4 (RBP-4), (7) jelitowy czynnik trefoilowy 3 (TFF3) oraz (8) klusteryna (CLU). Fakty przedstawiane przez Doktorantkę poparte są bogatą literaturą przedmiotu swoją w temacie. Drobne potknięcia stylistyczne w tym rozdziale nie wpływają w żaden sposób na wartość merytoryczną pracy. Ważność tematu podjętego w rozprawie doktorskiej oraz sposób jego prezentacji dodatkowo podkreśla fakt, iż ten fragment rozprawy został już opublikowany (Journal of Immunology Research; IF=4.493; pkt.100).

Hipotezy i cele badawcze

Głównym celem badawczym była ocena biomarkerów wykorzystywanych do diagnostyki uszkodzenia nerek u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerki. *Przystępując do badań postawiono trzy hipotezy badawcze:* (1) stężenia biomarkerów zmieniają się istotnie w czasie (dzień, pół roku i rok po transplantacji); (2) stężenia biomarkerów korelują istotnie ze stężeniem kreatyniny w tym samym punkcie czasowym; (3) wybór metody

diagnostycznej wykorzystanej do diagnostyki uszkodzenia nerek u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerki nie wpływa istotnie na wartość ocenianych biomarkerów. *Szczegółowe cele badawcze obejmowały:* (1) określenie wartości diagnostycznej markerów, w tym lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilów (NGAL), cząsteczki-1 uszkodzenia nerek (KIM-1), chemokiny 10 z motywem C-X-C (CXCL-10), osteopontyny (OPN), cystatyny C (Cys C), białka wiążącego retinol 4 (RBP-4), jelitowego czynnika trefoilowego 3 (TFF3) oraz klusteryny (CLU) u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerki objętych rocznym okresem monitorowania; (2) porównanie wpływu metody na analizowane biomarkery oznaczane metodą ELISA oraz metodą fluorymetrii przepływowej xMap Luminex; (3) ustalenie czy stężenia badanych biomarkerów w surowicy i w moczu są uzależnione od czasu jaki upłynął od zabiegu przeszczepienia nerki; (4) ustalenie korelacji pomiędzy stężeniem badanych markerów u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerki i kreatyniną oraz biomarkerami i wartością szacowanego współczynnika filtracji kłębuszkowej u grupy badanej. Hipotezy i cele badawcze zostały skonstruowane poprawnie i nie budzą zastrzeżeń.

Materiał i Metody

Rozdział napisany bardzo starannie i poprawnie dla tego typu opracowań naukowych. Pani mgr Karolina Rogulska bardzo dobrze scharakteryzowała grupę badaną, zarówno osób chorych jak i zdrowych (grupa kontrolna) oraz materiał do badań (surowica i moczu). Badaniem objęto dorosłych pacjentów po transplantacji nerki z regionu północno-zachodniej Polski. Byli to pacjenci Poradni Transplantologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 PUM w Szczecinie. Badania prowadzono przez 5 lat. Grupa chorych obejmowała 19 pacjentów (9 kobiet i 10 mężczyzn w wieku od 26 do 71 lat (średnia wieku badanych $51,9 \pm 12,1$ lat)), a grupa zdrowych 5 osób. Oprócz powyższych danych Autorka w tym rozdziale umieściła w formie tabelarycznej bardzo szczegółową charakterystykę grupy pacjentów przed przeszczepem allogenicznym nerki, w której uwzględniono wartości klasycznych parametrów laboratoryjnych (kreatynina, szacowany współczynnik filtracji nerkowej, mocznik, sód, potas, chlorki, przeciwciała przeciw CMV w klasie IgG). W rozdziale metody nie znalazłam metodyki opisującej oznaczenie tychże w/w klasycznych parametrów laboratoryjnych. Należy to uczynić przygotowując manuskrypt do publikacji. Do realizacji głównego celu badawczego Pani mgr Karolina Rogulska posłużyła się metodą fluorymetrii przepływowej- xMap Luminex oraz metodą immunoenzymatyczną- ELISA. Dobór metod badawczych świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Autorki.

Wyniki

Rozdział „Wyniki” stanowi bardzo obszerną część pracy, bo liczącą aż, 63 strony. Zaprezentowany opis wyników jest wyczerpujący i zrozumiały. Wyniki poparte poprawnymi obliczeniami statystycznymi w bardzo czytelny sposób ilustrują tabele. Konstrukcja tego rozdziału świadczy o dużej dojrzałości naukowej Autorki. Najpierw prezentuje wartości biomarkerów u pacjentów po przeszczepie nerki oznaczonych dwoma metodami -ELISA i Luminex, następnie zmiany wartości stężeń biomarkerów w czasie (dzień, pół roku po i rok po przeszczepie), następnie analizuje związki pomiędzy biomarkerami w surowicy i moczu, a także pomiędzy klasycznymi biomarkerami biochemicznymi nerek (kreatynina z szacowaniem współczynnika filtracji nerkowej), a pozostałymi ośmioma biomarkerami; kończąc porównaniem wartości biomarkerów oznaczonych metodą ELISA i Luminex w grupie badanej. Wszystkie zaprezentowane w rozprawie wyniki mają charakter doniesień oryginalnych i wszystkie są bardzo wartościowe.

Dyskusja

Rozdział bardzo merytoryczny. Autorka skonstruowała go specyficznym dzieląc domyślnie na dwie części. W pierwszej zaprezentowała dane z piśmiennictwa naukowego i badań własnych dotyczące uzyskanych wartości ośmiu badanych białek- NGAL, KIM-1, CXCL-10, OPN, Cys C, RBP-4, TFF3, CLU w surowicy i/lub moczu pacjentów po przeszczepie nerek. W drugiej natomiast omówiła każde z nich jako biomarker uszkodzenia nerek na tle badań innych autorów. Przy każdym z białek wyraźnie określiła jego potencjał diagnostyczny jako biomarkera u pacjentów po przeszczepie nerek. Taki sposób poprowadzenia dyskusji świadczy o dużej skrupulatności Autorki i znajomości tematu.

Wnioski

Pani mgr Karolina Rogulska wnioski ze swojej rozprawy doktorskiej zaprezentowała w postaci sześciu syntetycznych punktów, które są odpowiedzią na cel główny postawiony w rozprawie jak i cele szczegółowe. Wnioski są poprawne, dobrze sformułowane i wynikają z uzyskanych wyników badań.

Piśmiennictwo

Bardzo obszerne bo obejmujące aż 312 pozycji anglojęzycznych, w tym najbardziej aktualnych z 2023 r. Taki stan rzeczy świadczy o skrupulatności Pani mgr Karoliny Rogulskiej i dociekliwości jako „młodego badawcza”. Dobór literatury bardzo dobry i swoisty w temacie.

Wykaz tabel i rycin

Wykaz tabel i rycin zaprezentowany w sposób przejrzysty i czytelny.

Streszczenie w języku polskim i angielskim

Typowe i dobrze skonstruowane.

Załączniki

Trzy załączniki zaprezentowane w sposób czytelny i przejrzysty.

3. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Rogulskiej pt.: „**Wybrane biomarkery diagnostyczne u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerek**” jest opracowaniem oryginalnym, dobrze napisanym, a jej ciężar merytoryczny jest właściwy dla pracy doktorskiej. Badania przeprowadzone przez Autorkę miały jasno postawiony cel, zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane. Wyniki przedstawione w sposób wyczerpujący i jasny. Rozprawa zawiera merytoryczną dyskusję i dobre wnioski. Pani mgr Karolina Rogulska wykazała, że: **(1)** spośród ośmiu przebadanych biomarkerów pięć z nich: lipokalina związana z żelatynazą neutrofilów, cząsteczka-1 uszkodzenia nerek, cystatyna C, chemokina 10 z motywem C-X-C i jelitowy czynnik trefoilowy 3 mogłyby być wykorzystywane do rutynowej diagnostyki funkcji nerek po transplantacji tego narządu. Oznaczanie równoległe stężenia tych biomarkerów wraz z poziomem kreatyniny i eGFR zarówno w surowicy, jak i moczu pacjentów może dostarczać przydatnych informacji diagnostycznych; **(2)** stężenia biomarkerów w surowicy oraz moczu oznaczone metodą ELISA i xMap Luminex u pacjentów po transplantacji nerki zmieniają się w czasie (dzień, pół roku i rok po przeszczepieniu nerek); **(3)** wartości stężenia biomarkerów u pacjentów po przeszczepieniu nerki oznaczonych w

różnych punktach czasowych dwiema metodami różnią się istotnie od wartości tych białek oznaczonych u pacjentów z grupy kontrolnej; (4) istnieje korelacja pomiędzy stężeniami pięciu biomarkerów NGAL, KIM-1, CXCL-10, TFF3 i Cys C w surowicy i/lub moczu pacjentów, a stężeniem kreatyniny i wartością eGFR głównie w pierwszym dniu po przeszczepieniu nerki; (5) wybór metody diagnostycznej (ELISA lub xMap Luminex) wpływa na wartość stężenia badanych biomarkerów w surowicy lub moczu z wyjątkiem stężenia osteopontyny.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Rogulskiej spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. z późniejszymi zmianami, Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Zatem może być podstawą do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu; w dyscyplinie nauki medyczne. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Karoliny Rogulskiej do dalszego postępowania kwalifikacyjnego, celem uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Ponadto ze względu na ważność i aktualność podjętego problemu badawczego-poszukiwanie biomarkerów białkowych w postępowaniu diagnostycznym odzwierciedlających wczesną fazę uszkodzenia nerek u pacjentów po przeszczepie allogenicznym nerki, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o wyróżnienie *summa cum laude* rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Rogulskiej.

UNIwersytet SZCZECIŃSKI
Instytut Biologii

dr hab. Beata Bukowska-Szematowicz
prof. US