

10.03.2022r.



Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr. inż. Natalii Kraty zatytułowanej: **„Peroksyredoksyny – markery stresu oksydacyjnego – w przewlekłej chorobie nerek o różnej etiologii”**

Rozprawa doktorska procedowana na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Wśród chorób cywilizacyjnych XXI wieku, oprócz cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, otyłości i chorób sercowo-naczyniowych (SN), od niedawna wymienia się także przewlekłą chorobę nerek (PChN). Choroba ta jest ogólnoustrojowym zespołem objawów klinicznych, spowodowanych stopniowym spadkiem liczby funkcjonujących nefronów, który stanowi końcowy efekt wszystkich nefropatii, niezależnie od etiologii. Oprócz klasycznych czynników ryzyka chorób SN, takich jak otyłość, wiek, płeć męska, palenie tytoniu, zaburzenia lipidowe, w grupie chorych z PChN wyodrębniono również szereg czynników związanych ściśle z chorobą nerek i rozwijającym się zatruciem toksynami mocznicowymi. Należą do nich m.in. niedokrwistość, niedożywienie, obecność zwapnień w błonie wewnętrznej i środkowej ściany naczyń tętniczych, zaburzenia gospodarki mineralno-kostnej związane z PChN, przewlekły stan zapalny, oraz stres oksydacyjny. Peroksyredoksyny dwucysteinowe (2-Cys-PRDX), mają znaczenie w patogenezie i progresji PChN. Mają zdolność do redukcji nadmiaru nadtlenu wodoru, jednego z najważniejszych mediatorów stresu oksydacyjnego. Ponadto, 2-Cys-PRDX funkcjonują jako czaperony oraz regulatory i przekaźniki sygnałów komórkowych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zatytułowana: „Peroksyredoksyny – markery stresu oksydacyjnego – w przewlekłej chorobie nerek o różnej etiologii” obejmuje 12 rozdziałów, w tym wykaz publikacji tworzących koherentną pracę, wstęp, założenia i cel pracy, podsumowanie, wnioski, wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń, spis rycin, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis piśmiennictwa, kserokopię opinii Komisji Bioetycznej i oświadczeń współautorów publikacji. Ponadto dokumenty zawierają zestawienie najważniejszych osiągnięć naukowych w postaci analizy bibliometrycznej całokształtu dorobku publikacyjnego o łącznym współczynniku oddziaływania- IF- 22,557 i punktacji MEiN- 590. Zbiór zawiera także zgłoszenie patentowe.

Kolejno we wstępie zawartym w rozdziale 3, Kandydatka w sposób zwięzły aczkołwiek wyczerpujący, opierając się w głównej mierze na piśmiennictwie z ostatnich 10 lat, omawia zachorowalność i śmiertelność pacjentów z PChN, według ogólnościwiatowego badania obciążenia zdrowotnego (ang. *Global Burden of Disease, GBD*) z modyfikacją własną, z uwzględnieniem konieczności poszukiwania nowych markerów, specyficznych i czułych dla każdej z nefropatii, aczkołwiek brakuje definicji PChN. Ponadto we wstępie Doktorantka omawia przyczyny i skutki stresu oksydacyjnego wykorzystując dane z artykułu poglądowego ujętego w pracy koherentnej. Znacząca część wstępu poświęcona jest peroksyredoksynom dwucysteinowym (2-cys-PRDX), przeglądowi prac opublikowanych w ostatnich 5 latach dotyczących peroksyredoksyn i ich potencjalnym znaczeniu w progresji PChN, a także wskazuje rolę markera prognostycznego dla pacjentów z ostrym uszkodzeniem nerek. Autorka podkreśliła brak doniesień dotyczących roli peroksyredoksyn w przewlekłych kłębuszkowych zapaleniach nerek.

Na analizowaną rozprawę doktorską składają się dwie publikacje, w tym jedna o charakterze poglądowym oraz jedna - oryginalnym o autorstwie zbiorowym. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Artykuły opublikowane zostały w renomowanych, międzynarodowych czasopismach. Sumaryczny IF cyklu prac włączonych do rozprawy wynosi 7,169 i punktacji MEiN- 165 punktów. We wszystkich artykułach Kandydatka potwierdziła znaczący 50% - procentowy udział własny w przygotowywaniu każdej publikacji składających się na osiągnięcie naukowe. Każdy ze współautorów wskazanych artykułów pisemnie określił procentowy udział w opracowaniu prac, jednocześnie wyrażając zgodę na wykorzystanie przez mgr. inż. Natalii Kraty publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Cele pracy zostały w sposób jasny i czytelny sformułowane i obejmowały ocenę panelu peroksyredoksyn (1-5) w surowicy krwi pacjentów z PChN w przebiegu nefropatii IgA, błoniastej oraz toczniowej.

Praca pogładowa „Oxidative stress in kidney diseases: the cause or the consequence?” opublikowana w *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* w 2018 roku (IF- 2,878, MEIN- 25 pkt.) w sposób zwięzły przedstawia według dostępnego piśmiennictwa dane wynikające z przeprowadzonych badań dotyczące zjawiska stresu oksydacyjnego i roli niektórych markerów w PChN jak nitrotyrozyna (Tyr-NO₂), mieloperoksydaza (MPO) i oxidized low-density lipoprotein (OxLDL). Kolejna publikacja dotyczy już badań własnych. Doktorantka sięgnęła po nowoczesny warsztat badawczy uzyskując niezwykle interesujące wyniki. Należy podkreślić, że w literaturze głównie opracowywane są dane pochodzące z badań wykorzystujących modele zwierzęce. W sposób przemyślany, Doktorantka z niezwykłą starannością opracowała metodykę badań (uwzględnioną w artykule), zgodnie z Deklaracją Helsińską, po uprzedniej zgodzie wydanej przez Komisję Bioetyczną przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na brak metodyki badań w zbiorze dokumentów. Jedynie w rozdziale 6. *Założenia pracy* zostało w sposób opisowy uwzględnione zebranie materiału biologicznego i wykonanie badań eksperymentalnych. Natomiast metodyka badań opisana jest w sposób szczegółowy w dołączonej pełnej wersji artykułu „*Peroxiredoxins as markers of oxidative stress in IgA nephropathy, membranous nephropathy and lupus nephritis*” opublikowanego w 2022r. w *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (IF- 4,291, MEIN- 140 pkt.).

Badanie zostało zaprojektowane jako eksperymentalne, przeprowadzone w jednym ośrodku - Klinice Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych UCK WUM. Zakwalifikowano 108 pacjentów zakwalifikowanych po wykonanej biopsji, w tym 47 z IgA nefropatią, 26 z przewlekłym błoniastym kłębuszkowym zapaleniem nerek oraz 35 chorych ze zdiagnozowaną glomerulopatią w przebiegu tocznia układowego. Ponadto oznaczano markery w grupie kontrolnej, składającej się ze zdrowych ochotników. Kandydatka następnie poddała szczegółowej analizie statystycznej (używając R wersji 3.6.1. i *STATISTICA* wersji 13.1) wyniki, które zostały opublikowane po uzyskaniu pozytywnych recenzji w czasopiśmie naukowym o wysokim współczynniku oddziaływania, stanowiąc istotny wkład w rozwój nauki. Doktorantka przedstawiła wyniki badania w postaci 3 tabel i 5 rycin zawartych w artykule. Ponadto analiza Spearman'a dotycząca korelacji PRDXs z biochemicznymi i

klinicznymi oznaczeniami została ujęta w materiale dodatkowym pod postacią dołączonej tabeli 1.

W publikacji Kandydatka przedstawia wyniki oznaczeń stężenia peroksyredoksyn 1-5 w surowicy krwi pacjentów z wybranymi kłębuszkowymi zapaleniami nerek tj. nefropatią IgA, nefropatią błoniastą, nefropatią toczniową oraz u osób z grupy kontrolnej, które skorelowano z parametrami klinicznymi i demograficznymi.

Należy zwrócić uwagę, że otrzymane wyniki są częścią wyników będących treścią zgłoszenia patentowego z 2018 roku - nr: PCT/EP2018/052837; WO 2018/141975 A1: *Use of serum 2-cysteine peroxiredoxins (2-cys-prdx) as biomarkers of chronic kidney diseases*, które po odesłaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów, jest rozpatrywane w Europejskim Urzędzie Patentowym. Doktorantce udało się wykazać, że badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej potwierdzają, że peroksyredoksyny 1-5 mogą mieć istotne znaczenie kliniczne w pełniejszym zrozumieniu patofizjologii PChN o etiologii kłębuszkowych zapaleń nerek. Niezwykle interesujące są wyniki, które potwierdzają, że stężenia poszczególnych 2-Cys-PRDX w surowicy, różnią się w zależności od typu kłębuszkowego zapalenia nerek tj. nefropatii IgA, nefropatii błoniastej oraz nefropatii toczniowej. Pacjenci z PKZN mieli podwyższone PRDX w porównaniu z grupą kontrolną- z IgA nefropatią mieli znacznie wyższe stężenia PRDX 1 i 2 ($p < 0,001$ i $< 0,043$, odpowiednio; jednak tylko wartości PRDX 1 pozostały istotne po korekcie Bonferroniego), pacjenci z nefropatią błoniastą mieli prawie takie same stężenia PRDX, z wyjątkiem PRDX 2 ($p = 0,001$); natomiast stężenia PRDX 2, 3 i 4 w grupie pacjentów z nefropatią toczniową były istotnie podwyższone ($p < 0,001$) w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami. Niezwykłą wartość posiadają znaczne różnice między grupami chorób. Aby potwierdzić dokładność diagnostyczną poziomów PRDX, Doktorantka wykonała analizę ROC w celu wzmocnienia znaczenia uzyskanych wyników. Uzyskano najmocniejsze wartości AUC dla PRDX 2 (0,652) i 4 (0,653) w celu rozróżnienia glomerulopatii z kontroli i dla PRDX 1 do rozróżniania IgA nefropatii z nefropatią toczniową (0,733) i nefropatią błoniastą (0,788).

Ponadto Doktorantka wykazała korelacje pomiędzy stężeniami poszczególnych 2-Cys-PRDX, a obniżonym wskaźnikiem przesączania kłębuszkowego, stężeniem białek układu dopełniacza w surowicy, stężeniem hemoglobiny czy też BMI. Co niezwykle istotne Kandydatce udało się wykazać, że badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej potwierdzają, że peroksyredoksyny 1-5 mogą mieć istotne znaczenie kliniczne w pełniejszym zrozumieniu patofizjologii PChN o etiologii kłębuszkowych zapaleń nerek.

Kandydatka wykazując się umiejętnością dyskusji otrzymanych wyników, w sposób dojrzały przeprowadziła omówienie wyników w zakresie dostępnego piśmiennictwa w tej tematyce. Na szacunek zasługuję również fakt, że Kandydatka sama wskazuje na aspekt niedoskonałości pracy i potrzebę prospektywnego badania walidacyjnego nad potencjalnym wykorzystaniem 2-Cys-PRDX jako markerów w chorobach nerek na większej grupie badanych oraz konieczności oceny ekspresji peroksyredoksyn (1-5) w bioptatach nerek, co niezmiennie podniosłoby wartość otrzymanych wyników. Przeprowadzenie wyżej wymienionych badań mogłoby potwierdzić hipotezę, że monitorowanie stężenia 2-Cys-PRDX może służyć jako marker dla poszczególnych przewlekłych kłębuszkowych zapaleń nerek.

Wnioski prezentowane w cyklu prac odpowiadają na postawione tezy wskazując na istotne znaczenie stresu oksydacyjnego ocenianego na podstawie stężenia 2-Cys-PRDX w PChN. Ponadto różnice w poszczególnym PRDX, które uzyskano w wybranych nefropatiach wskazują na ich istotne znaczenie w patofizjologii zmian. Na podstawie badań przeprowadzonych przez Doktorantkę jestem przekonana, że po walidacji na większej grupie chorych, kompleksowe oznaczanie 2-Cys-PRDX może zostać dodatkowymi markerami dla poszczególnych glomerulopatii.

Zbiór dokumentów zawiera także opis działalności organizacyjnej i dydaktycznej, które wskazują na dojrzałość w samodzielnej pracy. Doktorantka otrzymała 4 nagrody, w tym 2 nagrody zespołowe Rektora WUM i 2 nagrody indywidualne za osiągnięcia naukowe. Jest współautorką 5 zgłoszeń patentowych.

Wielce Szanowna Rado Dysejpliny Nauk Medycznych,

Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Kraty jest przykładem kompleksowego, dobrze zaplanowanego badania eksperymentalnego, o ważnych implikacjach praktycznych. Wnioski wynikające z pracy potwierdzają, że peroksyredoksyny 1-5 mogą mieć istotne znaczenie kliniczne w diagnostyce i monitorowaniu efektów leczenia oraz progresji PChN, w szczególności o etiologii przewlekłych kłębuszkowych zapaleń nerek.

Wdrożenie wczesnej prewencji i modyfikacji terapii dzięki prostym, nieinwazyjnym badaniom w postaci powtarzalnych oznaczeń peroksyredoksyn 1-5 może skutkować zmniejszeniem progresji PChN, a co za tym idzie śmiertelności w tej grupie pacjentów.

Mając powyższe na uwadze, wnoszę do o dopuszczenie mgr inż. Natalii Kraty do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim, gdyż przedstawiona przez Nią rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (dz.U.2018 poz.1668). Ze względu na jakość i kompleksowość przeprowadzonych badań eksperymentalnych, niezmierną staranność samej pracy jak i uzyskane wyniki opublikowane w międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania – wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Dr hab. n.med., prof. UJ Katarzyna Krzanowska

Katedra i Klinika Nefrologii i Transplantologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie