

Olsztyn, 06 -09-2021

Prof. dr hab. Andrzej Pomianowski
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
W Olsztynie

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. wet. Karoliny Wrześniewskiej pt.: „Rola wybranych biomarkerów w diagnostyce uszkodzeń nerek w przebiegu przewlekłej niewydolności serca u psów”

Recenzję wykonano w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 24 czerwca 2021 r. powołującą mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej lek. wet. Karoliny Wrześniewskiej.

Nefrologia weterynaryjna należy do najbardziej dynamicznie rozwijających się dyscyplin klinicznych. Coraz dokładniejsze poznawanie funkcji układu moczowego u różnych gatunków zwierząt, stwarza nowe możliwości wykrywania zaburzeń tych funkcji. Stwarza to podstawę dla nowoczesnej diagnostyki, w tym też diagnostyki laboratoryjnej. Zakres badań dodatkowych w nefrologii weterynaryjnej ciągle się poszerza, a poszukiwanie metod, które mogłyby precyzyjnie i możliwie jak najwcześniej rozpoznać chorobę trwa nieprzerwanie. Rozwój niewydolności nerek może być związany z chorobami serca, stąd potrzeba oceny funkcji nerek w przebiegu niewydolności krążeniowej. Wczesna diagnostyka narządowa pozwala na postępowanie terapeutyczne spowalniające proces chorobowy i poprawiające komfort życia pacjenta. Szczególne znaczenie ma to u psów z zaburzeniami osi sercowo-naczyniowo-nerkowej.

Tym trudnym zagadnieniom naprzeciw wychodzi praca wykonana przez lek. wet. Karolinę Wrześniewską pt.: „Rola wybranych biomarkerów w diagnostyce uszkodzeń nerek w przebiegu przewlekłej niewydolności serca u psów”. Temat pracy uważam za aktualny i uzasadniony dla nauki i praktyki klinicznej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje 62 strony wydruku komputerowego, 2 ryciny, 8 tabel oraz 112 pozycji piśmiennictwa. Praca ma klasyczny układ, na który składają się: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, omówienie wyników i dyskusja, wnioski i wykaz piśmiennictwa. Do manuskryptu dołączone są oświadczenia promotora i autora pracy, wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

W obszernym wstępie Autorka omawia najczęściej występujące choroby serca u psów – kardiomiopatię rozstrzeniową oraz zwyrodnieniową chorobę zastawki dwudzielnej. W dalszej części tego rozdziału przedstawia aktualny stan wiedzy na temat zaburzeń osi sercowo-naczyniowo-nerkowej u psów, słusznie zauważając, że pomimo szerokiej wiedzy na ten temat wciąż jej patofizjologia pozostaje trudna do oceny i nie ma obecnie ustalonych wytycznych dotyczących diagnozowania i leczenia psów z zespołem sercowo-nerkowym. Jako pomocne w procesie rozpoznawania rozwoju niewydolności nerek w przebiegu chorób serca u psów Autorka wskazuje oznaczenia biomarkerów wczesnego uszkodzenia nerek, co stanowiło podstawę jej dysertacji.

Logicznie i jasno sprecyzowany cel pracy obejmował wykazanie efektywności oznaczania wybranych wskaźników w poszukiwaniu biomarkerów uszkodzenia nerek w przebiegu niewydolności serca spowodowanej przez kardiomiopatię rozstrzeniową i zwyrodnieniową chorobę zastawki dwudzielnej u psów. W realizacji tego celu wykorzystano pomiary stężenia w surowicy cystatyny C, cząsteczki -1 uszkodzenia nerek (KIM-1; ang. *kidney injury molecule - 1*) i lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilii (NGAL; ang. *neutrophil-gelatinase associated lipocalin*).

Rozdział Materiał i metody zawiera informacje dotyczące zwierząt zakwalifikowanych do badań oraz metodyki przedstawionych badań przedstawionych w sposób szczegółowy i zrozumiały. Badaniami objęto łącznie 75 psów. Grupa psów z kardiomiopatią rozstrzeniową liczyła 9 psów w stadium B rozwoju niewydolności serca. Grupa ze zwyrodnieniem zastawki dwudzielnej liczyła 49 psów, w tym 19 w stadium B 1, 20 w stadium B 2 i 10 w stadium C. Grupę kontrolną stanowiło 17 zdrowych psów. U wszystkich zwierząt wykonano pełne badanie kliniczne z pomiarem ciśnienia, EKG, RTG, echokardiografią oraz hematologiczne i biochemiczne.

Badania hematologiczne wykonano analizatorem HORIBA SCIL VET ABC+, Japonia. Oznaczano parametry i wskaźniki układu czerwonokrwinkowego: liczbę erytrocytów, stężenie hemoglobiny, liczbę hematokrytową, średnią objętość krwinki czerwonej, średnią zawartość hemoglobiny, średnie stężenie hemoglobiny, RDW (wskaźnik anizocytozy erytrocytów), liczbę płytek krwi i MPV (średnią objętość płytek). Oznaczano również parametry układu białokrwinkowego w tym liczbę krwinek białych z rozdziałem procentowym i ilościowym na granulocyty obojętnochłonne, kwasochłonne, limfocyty i monocyty.

Badania biochemiczne obejmowały oznaczenia kreatyniny, mocznika, glukozy, białka całkowitego, cholesterolu, fosfatazy alkalicznej, aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginianowej, wapnia całkowitego wykonane aparatem HORIBA ABX PENTRA 400, Japonia. Stężenia sodu, potasu i wapnia zjonizowanego były badane analizatorem AVL 9180, Roche, Szwajcaria.

Badania biomarkerów uszkodzenia nerek: cystatyny C, KIM-1 i NGAL w surowicy oznaczano metodą ELISA przy użyciu testów specyficznych dla psów.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej przy pomocy testów Shapiro-Wilka, Levene'a, Kruskala-Wallisa oraz U Manna -Whitney'a z poprawką Bonferroniego.

W rozdziale Omówienie wyników i dyskusja Doktorantka komentując uzyskane wyniki badań przeprowadza ich wnikliwą analizę i co warte podkreślenia czyni to w sposób krytyczny, wykazując przy tym umiejętność interpretacji i dojrzałość badacza. Porównując średnie wartości parametrów układu czerwonokrwinkowego i białokrwinkowego pomiędzy badanymi grupami Autorka stwierdza, że zmiany w obrazie krwi obwodowej są niewielkiego stopnia. Podobne wyniki uzyskano w badanych parametrach biochemicznych. Mianowicie większość wartości oznaczanych parametrów w badanych grupach psów mieściło się w granicach norm fizjologicznych i nie różniło się między sobą statystycznie. Lek. wet. Karolina Wrześniewska odnosi się do tych wyników wyjaśniając, iż badania hematologiczne i biochemiczne nie mają większego znaczenia w rozpoznawaniu DCM i MMDV. Jednakże ich wykonywanie jest uzasadnione w celu wykluczenia innych jednostek chorobowych, co było istotne dla właściwej oceny funkcji pracy serca i nerek w prezentowanych badaniach własnych.

Interesujące wyniki uzyskała Doktorantka w zakresie badanych markerów uszkodzenia nerek. Mianowicie, ze względu na niejednoznaczność analizy tych wyników oraz trudności interpretacyjne, wzorując się na innych autorach wprowadziła dodatkowy element oceny funkcji nerek w postaci wskaźników stosunku poziomu stężenia cystatyny C, KIM-1 i NGAL do poziomu kreatyniny. Dzięki temu wykazała większą przydatność oznaczania tych parametrów w odniesieniu do stężenia kreatyniny, aniżeli ocenę tylko ich pojedynczych wartości.

Ocena rozwoju niewydolności nerek dotyczyła psów z niewydolnością sercową spowodowaną przez kardiomiopatię rozstrzeniową i chorobę zwyrodnieniową zastawki dwudzielnej w fazie bezobjawowej. Doktorantka udowodniła, że w przypadku DCM wartość diagnostyczną dla oceny wczesnych zmian w nerkach uzyskuje jedynie surowicze stężenie NGAL i wskaźnik NGAL/kreatynina. Krytycznie stwierdza, iż istotność statystyczna tylko tych dwóch, z kilku badanych parametrów, ogranicza interpretację i nie pozwala na wyciągnięcie

wniosków dotyczących obecności, lokalizacji i typu zmian mogących rozwijać się w nerkach w przebiegu tej choroby. Być może było to związane ze zbyt małą liczbą zwierząt w badanej grupie. Niezaprzeczalnym osiągnięciem lek. wet. Karoliny Wrześniewskiej jest wykazanie, że w przypadku psów z MMVD zastosowanie wskaźników cystatyna C/kreatynina, KIM-1/kreatynina, i NGAL/kreatynina może poszerzać w istotny sposób swoistość oceny diagnostycznej i zwiększać możliwości interpretacyjne wyników. W toku całej przedstawionej dyskusji Doktorantka wykazuje wszechstronną znajomość opracowanego zagadnienia a także obiektywizm i niezbędną ostrożność.

Pięć wniosków kończących pracę stanowią oryginalne osiągnięcia Autorki. Znajdują one w pełni uzasadnienie merytoryczne w uzyskanych wynikach badań. Wynikającym z wniosków fundamentalnym osiągnięciem recenzowanej pracy jest fakt dokonania przez Autorkę kompleksowej i szczegółowej analizy możliwości diagnostycznych wybranych biomarkerów w diagnostyce uszkodzeń nerek w przebiegu przewlekłej niewydolności serca u psów.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zgłosić pewne zastrzeżenia głównie natury redakcyjnej. Na stronie 19 wers 26. manuskryptu wkradł się błąd i komórki nabłonka kanalików bliższych eksponowane są na duże ilości związków nefrotoksycznych, a nie jak pisze Autorka neurotoksycznych. W opisie metod dobrze byłoby określić szczegółowo, że chodzi o krew żylną i z jakiego naczynia krwionośnego była pobierana. W tabeli 4 wśród badanych parametrów znajdują się granulocyty. Należałoby określić precyzyjnie, że chodzi tu o granulocyty obojętnochłonne.

Jako recenzent sugeruję także aby wniosek pierwszy zredagować bardziej syntetycznie, gdyż lepiej brzmiałby gdyby miał bardziej zwięzłą formę. W cytowanym w manuskrypcie piśmiennictwie radziłbym zmniejszyć liczbę artykułów z pism branżowych o charakterze popularnonaukowym, co podniesie wartość pracy w trakcie przygotowywania jej do publikacji.

Niezależnie od tych niewielkich uwag o charakterze redakcyjnym, nie umniejszających wartości merytorycznej dysertacji, chciałbym podkreślić, że praca jest napisana w dobrym stylu.

Reasumując należy stwierdzić, że oceniana rozprawa została zaplanowana, wykonana i przedstawiona poprawnie. Ma dużą wartość poznawczą i aplikacyjną oraz rozszerza wiedzę dotyczącą diagnostyki zaburzeń osi sercowo-nerkowej u psów.

Oceniana praca spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669).

W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autorki lek. wet. Karoliny Wrześniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr. hab. Andrzej Pomianowski


KIEROWNIK KATEDRY
CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH Z KLINIKĄ
prof. dr hab. Andrzej Pomianowski