

Prof. dr hab. n. wet. Roland Kozdrowski  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej UMK  
Ul. Gagarina 11, 87-100 Toruń

Toruń 22.07.2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Natalii Siwińskiej pt.:**  
*Diagnostyka wczesnego uszkodzenia nerek u koni przy użyciu*  
*badania ultrasonograficznego i biomarkerów w surowicy krwi i moczu*  
wykonanej w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów,  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu  
pod kierunkiem prof. dr hab. Urszuli Pasławskiej

**Życiorys naukowy lek. wet. Natalii Siwińskiej**

Pani lek. wet. Natalia Siwińska ukończyła studia w 2013 r. na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, uzyskując tytuł lekarza weterynarii, a w 2019 r. zdała egzamin specjalizacyjny z zakresu chorób koni. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Jej aktualny dorobek naukowy stanowi 27 prac opublikowanych w czasopismach wyróżnionych na liści JCR, co przekłada się na sumaryczny IF 46,095. Ponadto jest współautorką 39 prac popularno-naukowych opublikowanych w czasopismach branżowych dla lekarzy weterynarii. Odbyła również sześć staży naukowych w ośrodkach angielskich, austriackich, belgijskich, niemieckich oraz szkockich.

**Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej**

Podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora jest cykl wykazanych poniżej sześciu zbieżnych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z listy JCR o łącznym IF 11,292, co przekłada się na liczbę punktów równą 510 obliczoną zgodnie z obowiązującymi wytycznymi MNiSW:

1. **Siwińska N.**, Żak A., Slowikowska M., Szczepankiewicz B., Niedzwiedz A., Pasławska U. An assessment of the utility and repeatability of the renal resistive index in horses. PLOS ONE 2019, 14(12): e0226941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226941>  
MNiSW: 100 pkt; IF2019: 2,740
2. **Siwińska N.**, Żak A., Slowikowska M., Pasławska U. Renal resistive index as a potential indicator of acute kidney injury in horses. Journal of Equine Veterinary Science 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103662>.  
MNiSW: 70 pkt; IF2021: 1,1
3. **Siwińska N.**, Żak A., Slowikowska M., Niedzwiedz A., Pasławska U. Serum symmetric dimethylarginine concentration in healthy horses and horses with acute kidney injury. BMC Vet Res 2020, 16, 396. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02621-y>  
MNiSW: 100 pkt; IF2020: 1,860
4. **Siwińska N.**, Żak A. Pasławska U. Detecting acute kidney injury in horses by measuring the concentration of symmetric dimethylarginine in serum. Acta Vet Scand 63, 3 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13028-021-00568-0>  
MNiSW: 100 pkt; IF2020: 1,683
5. **Siwińska N.**, Żak A., Pasławska U. Evaluation of serum and urine neutrophil gelatinase associated lipocalin and cystatin C as biomarkers of acute kidney injury in horses. Journal of Veterinary Research 2021, 65. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0025>  
MNiSW: 40 pkt; IF2021: 1,039
6. **Siwińska N.**, Pasławska U., Bąchor R., Szczepankiewicz B., Żak A., Grocholska P., Szewczuk Z. Evaluation of podocin in urine in horses using qualitative and quantitative methods. PLOS ONE 2020, 15(10): e0240586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240586>  
MNiSW: 100 pkt; IF2020: 2,870

Prace te opatrzone są wspólnym tytułem *Diagnostyka wczesnego uszkodzenia nerek u koni przy użyciu badania ultrasonograficznego i biomarkerów w surowicy krwi i moczu*, i zostały przedstawione do recenzji w formie autoreferatu naukowego. W powstaniu każdej z tych prac Doktorantka odegrała kluczową rolę poprzez udział w: planowaniu i wykonaniu doświadczenia, klasyfikacji zwierząt do badań, analizie uzyskanych wyników i przygotowaniu manuskryptów, co potwierdzają dołączone do autoreferatu oświadczenia współautorów. Należy nadmienić, że w każdej z tych prac Doktorantka jest pierwszym oraz korespondencyjnym autorem. Prace te powstały po akceptacji procedury doświadczałnej przez Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach lub nie wymagały takiej akceptacji z uwagi na mało-inwazyjne,



rutynowe, lekarsko-weterynaryjne czynności diagnostyczne powszechnie wykonywane na pacjentach podejrzanych o zaburzenia funkcji nerek.

### **Wstęp pracy doktorskiej**

W tym miejscu Doktorantka zwraca uwagę, że choroby nerek nie są często notowane u koni, przy czym *silna (>10 mg/dL) lub długotrwała (trwająca ponad 72 h) azotemia wiąże się z pogorszeniem rokowania i podwyższeniem śmiertelności hospitalizowanych koni*. Sporo uwagi poświęca klasyfikacji uszkodzeń nerek, w oparciu o które możliwa jest ocena stadium uszkodzenia nerek, co jest związane z wyborem metody leczenia oraz oszacowaniem rokowania. Zaznacza, że *zaburzenia hemodynamiczne są stosunkowo częstą przyczyną ostrego uszkodzenia nerek u koni i występują głównie jako komplikacja w przebiegu kolki, sepsy i miopatii*. Z innych przyczyn wymienia stosowanie NLPZ oraz antybiotyków, szczególnie z grupy aminoglikozydów. Ostre uszkodzenie nerek ma u koni z reguły przebieg podkliniczny, a objawy nasuwające możliwość wystąpienia choroby są niespecyficzne i obejmują np. utratę apetytu. Następnie Doktorantka charakteryzuje możliwości diagnostyczne w przebiegu ostrego uszkodzenia nerek oraz definiuje na podstawie literatury cechy „idealnego” biomarkera, charakteryzując wady i zalety poszczególnych biomarkerów w diagnostyce chorób nerek.

### **Cele pracy doktorskiej zostały sprecyzowane następująco:**

- 1) *Określenie wartości referencyjnych wskaźnika oporu nerkowego (RRI) oraz biomarkerów wczesnego uszkodzenia nerek u koni tj. symetrycznej dimetyloargininy (SDMA), lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilową (NGAL), cystatyny C i podocyny.*
- 2) *Ocena wpływu czynników pozanerkowych na wartości RRI oraz wybranych biomarkerów wczesnego uszkodzenia nerek.*
- 3) *Ocena korelacji pomiędzy klasycznymi a nowoczesnymi biomarkerami uszkodzenia nerek.*
- 4) *Ocena przydatności wybranych klasycznych i nowoczesnych biomarkerów do wykrycia ostrego uszkodzenia nerek (AKI) na etapie klinicznym i podklinicznym.*
- 5) *Ocena wpływu czynników potencjalnie nefrotoksycznych na RRI oraz wybrane parametry krwi i moczu u koni.*

### *Cele dodatkowe przeprowadzonych badań:*

- 6) *Ocena powtarzalności pomiaru RRI u koni zdrowych.*
- 7) *Ustalenie, czy wykrycie podocyny w moczu koni będzie możliwe przy zastosowaniu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS-MRM) i wybranej sekwencji*

*peptydu oraz specyficznego gatunkowo testu ELISA, a także czy wyniki uzyskane obiema metodami będą zgodne.*

### **Wyniki i ich analiza**

Wyniki dotyczące wartości referencyjnych wskaźnika oporu mierzonego w naczyniach wewnątrznerkowych, wykorzystując ultrasonografię dopplerowską uzyskano przeprowadzając badania na źrebiętach, koniach dorosłych i starszych koniach. Wyniki opublikowano w pracy wykazanej pod nr 1. W ramach tych badań nie stwierdzono różnic w zakresie badanego parametru między źrebiętami i końmi dorosłymi, natomiast u koni starszych wartości oporu przepływu w naczyniach wewnątrznerkowych były istotnie wyższe. Z kolei w pracy nr 2 wykazano wzrost wskaźnika oporu w tętnicach wewnątrznerkowych u koni z ostrym uszkodzeniem nerek. Niemniej zmiany te były jedynie obserwowane w nerce prawej. Dodatkowo w tej pracy nie wykazano u koni będących w grupie ryzyka wystąpienia ostrego uszkodzenia nerek (kolka, terapia przy użyciu gentamycyny bądź NLPZ) wzrostu oporu przepływu w naczyniach wewnątrznerkowych. Na podstawie tych badań Doktorantka stwierdza, że ocena wartości oporu przepływu w tętnicach wewnątrznerkowych nie jest miarodajnym markerem funkcji nerek u koni, a przeprowadzenie tego typu diagnostyki szczególnie u koni „niewspółpracujących” jest trudne. W pracy nr 3 wykazano, że stężenie symetrycznej dimetyloargininy (SDMA) jest wyższe u źrebiąt i u koni z ostrym uszkodzeniem nerek w porównaniu do zdrowych koni dorosłych. Nie wykazano u zdrowych koni dorosłych zależności pomiędzy stężeniem symetrycznej dimetyloargininy, a wiekiem, płcią i masą ciała. Niemniej wykazano pozytywną korelację pomiędzy stężeniem kreatyniny, a stężeniem symetrycznej dimetyloargininy w surowicy krwi. W pracy nr 4 nie wykazano wzrostu symetrycznej dimetyloargininy u koni będących w grupie ryzyka wystąpienia ostrego uszkodzenia nerek. Niemniej konie z grupy ryzyka miały wyższe stężenie białka w moczu oraz wyższe wartości stosunku stężenie białka w moczu/stężenie kreatyniny w moczu. Graniczna wartość stężenia symetrycznej dimetyloargininy w surowicy krwi wskazująca na chorobę nerek została oszacowana na poziomie 19 µg/dL. W pracy nr 5 wykazano znaczący wzrost zarówno w moczu jak i w surowicy lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilową (NGAL) oraz cystatyny C u koni z ostrym uszkodzeniem nerek. Natomiast w pracy nr 6 wykazano, że stężenie podocyny w moczu może być potencjalnym biomarkerem zdrowia nerek u koni, a wyniki uzyskane metodą ELISA są zbliżone do wyników uzyskanych w drodze pomiarów wykonanych przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas.



W autoreferacie sformułowano cztery wnioski końcowe, wypływające z wyników przedstawionych w pracach będących podstawą rozprawy doktorskiej. Wnioski te są nieco rozbudowane i pełnią jednocześnie rolę szerokich konkluzji jakie można było wyciągnąć po szczegółowej analizie uzyskanych wyników. W oparciu o powyższe stwierdzam, że cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane.

Doktorantka również stwierdza, że *uzyskane wyniki wskazują na potrzebę stworzenia panelu biomarkerów surowicy i moczu do wykrywania AKI u koni zamiast stosowania jednego uniwersalnego biomarkera. Wynika to z różnej specyfiki biomarkerów: biomarkery dysfunkcji, uszkodzenia lub/ stanu zapalnego, a także różnego miejsca ich uwalniania z uszkodzonej jednostki funkcjonalnej nerki.* Trudno się z takim spostrzeżeniem nie zgodzić, ale pytanie brzmi dlaczego w oparciu o tak szerokie badania Doktorantka nie zaproponowała takiego panelu biomarkerów? Moim zdaniem przeprowadzone badania upoważniają do wyciągnięcia tego typu praktycznych konkluzji.

Podsumowując cykl prac będących podstawą rozprawy doktorskiej muszę podkreślić ich wysoką wartość merytoryczną w każdym elemencie składowym oryginalno-badawczego artykułu naukowego tj. w zakresie przeglądu piśmiennictwa, celu pracy, doboru zwierząt do badań, zastosowanych metod analitycznych i statystycznych, prezentacji uzyskanych wyników oraz ich interpretacji.

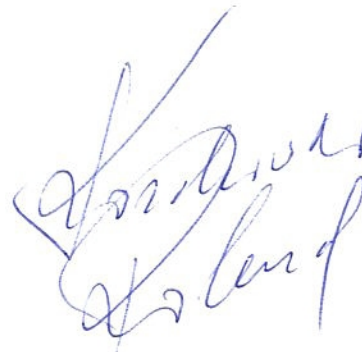
## **Podsumowanie**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest unikalną i cenną pozycją ukierunkowaną na diagnostykę ostrego uszkodzenia nerek u koni. Uzyskane w trakcie badań wyniki mogą być pomocne w diagnostyce uszkodzenia funkcji nerek na wczesnym etapie procesu chorobowego, co jest bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia. Ponadto monitoring pacjenta predysponowanego do zaburzeń funkcji nerek np. koni leczonych antybiotykami aminoglikozydowymi, czy też NLPZ, lub koni z objawami morzyska, dzięki niniejszej pracy doktorskiej może być bardziej obiektywny, a przez to istnieje możliwość korekcji podjętej terapii i przeciwdziałania wystąpieniu uszkodzenia nerek. Przeprowadzenie tych badań wymagało opanowania przez Doktorantkę szeregu technik diagnostycznych poprzez umiejętności bezpośrednio związane z pracą kliniczną, następnie analizę laboratoryjną zgromadzonego materiału badawczego, statystyczną „obróbkę” uzyskanych wyników oraz przygotowanie manuskryptów do publikacji. Zakres włożonej w to przedsięwzięcie pracy zaowocował publikacją sześciu bardzo dobrych artykułów naukowych, co wg mnie musi być podkreślone i

zasługuje na wyróżnienie. Dlatego też składam wniosek do Rady Dyscypliny Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o przyznanie lek. wet. Natalii Siwińskiej stosownej nagrody za pracę doktorską.

### **Wniosek końcowy**

Uważam, że praca doktorska lek. wet. Natalii Siwińskiej pt.: *Diagnostyka wczesnego uszkodzenia nerek u koni przy użyciu badania ultrasonograficznego i biomarkerów w surowicy krwi i moczu* odpowiada wymogom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki \*(Dz. U. Nr 65, poz. 595\*) stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Natalii Siwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Krzysztof...' followed by a surname, possibly 'Krzysztof...'.