

wpl. dnia 22-05-2023

L. GZ. RN-BM/

683

Łódź, 16.05.2023

**Prof. dr hab. n. med. Ilona Kurnatowska**

Klinika Chorób Wewnętrznych i Nefrologii Transplantacyjnej,  
I Katedra Chorób Wewnętrznych  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
*ilona.kurnatowska@umed.lodz.pl*

V/D/K

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE  
Przewodniczący

prof. dr hab. Agnieszka Haloń

## RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Lek Aleksandry Musiała

**„Biomarkery ogniskowego i segmentalnego kłębuszkowego zapalenia nerek (FSGS)**

**w optymalnej strategii diagnostyczno-terapeutycznej”**

promotorzy: dr hab. n. med. Dorota Kamińska

dr hab. n. med. Piotr Donizy, prof. UMW

Ogniskowe segmentowe stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS) jest jedną z najczęstszych przyczyn zespołu nerczycowego (ZN) u osób dorosłych, nie chorujących na cukrzycę, o zazwyczaj złym rokowaniu prowadzącym do schyłkowej niewydolności nerek (ESKD). FSGS jest nie heterogenną chorobą i często ma charakter wtórny, wówczas przebiega łagodniej, rzadziej prowadząc do ESKD. Bardzo istotne jest więc posiadanie narzędzia diagnostycznego które umożliwiłoby różnicowanie postaci pierwotnych od wtórnych (czasem wcale nie jednoznacznych pomimo posiadania potwierdzenia histopatologicznego choroby) zwłaszcza w kontekście postępowania terapeutycznego, gdyż postaci pierwotne FSGS wymagają włączenia systemowej steroidoterapii często uzupełnionej o inne leki immunosupresyjne, a postaci wtórne przede wszystkim nefroprotekcji oraz leczenia choroby podstawowej. Uzyskanie remisji choroby wiąże się z lepszym rokowaniem i mniejszym ryzykiem

AH

postępu do ESKD, choć można się również spodziewać nawrotów choroby. Dotychczas nie ustalono etiologii pierwotnego FSGS cały czas poszukuje się czynników, które prowadzą do uszkodzenia podocytów i mogłyby jednocześnie stanowić biomarkery diagnostyczno-terapeutyczno-rokownicze tej jednostki chorobowej. Z tym tematem – biomarkerów oznaczanych immunohistochemicznie w biopunktacie nerki u chorych z FSGS, postanowiła zmierzyć się Doktorantka w swojej pracy naukowej będącej tematem rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do oceny praca liczy 104 strony, w tym 39 tabel, 17 rycin w tym 8 fotografii dokumentujących obrazy immunohistopatologiczne bioptatów nerki i ma układ typowy dla prac na stopień naukowy doktora. Na początku Autorka zamieściła spis treści oraz wyjaśnienie stosowanych skrótów. Wyodrębnione rozdziały to Wstęp, Cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim. Na końcu pracy umieszczono spis tabel i rycin oraz bardzo trafnie dobranych i aktualnych 147 pozycji piśmiennictwa. Podział poszczególnych rozdziałów na podrozdziały powoduje, że praca staje się bardziej czytelna i łatwiejsza w interpretacji.

Wstęp dysertacji zawiera aktualne informacje dotyczące epidemiologii FSGS, jej postaci pierwotnej w tym genetycznej, wtórnych przyczyn z charakterystyką objawów klinicznych i laboratoryjnych poszczególnych typów tej nefropatii oraz charakterystykę zmian histopatologicznych występujących w FSGS z ich obrazem klinicznym oraz rokowaniem. Autorka szczegółowo omawia poszczególne rodzaje FSGS oraz strategię aktualnego postępowania terapeutycznego z uwzględnieniem obowiązujących schematów leczenia. Omawia również nowe leki biologiczne, które w przyszłości być może zostaną wykorzystane w praktyce klinicznej: adalimumab oraz abatacept. We wstępie opisuje również aktualny przegląd piśmiennictwa dotyczący badań nad biomarkerami w FSGS, poświęcając szczególną uwagę dwóm, których ekspresję w badaniu immunohistopatologicznym w bioptatach chorych z FSGS będzie badała: polimerazie poli (ADP-rybozy) 1 (PARP-1) oraz enzymowi 2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO-1).

Wiele danych z piśmiennictwa przemawia za niekorzystnymi efektami PARP-1 w nerkach, zaś inhibitor PARP-1 stosowano m.in. w zapobieganiu nefrotoksyczności wywołanej przez cisplatynę, jak również w leczeniu wspomagającym w chorobie Alzheimera, czy łagodzeniu niedokrwienia mięśnia sercowego i hamowaniu postępu powikłań sercowo-naczyniowych związanych z cukrzycą. Być może to korzystne działanie ma związek ze zmniejszeniem stresu oksydacyjnego oraz działaniem przeciwzapalnym. Wydaje się również,

że inaktywacja PARP-1 ma działanie nerkoochronne w różnych typach uszkodzenia nerki. We wstępie, Doktorantka bardzo szczegółowo omawia rolę PARP1 zarówno w patogenezie różnych chorób nerek w tym KZN jak i potencjalną korzystną rolę hamowania ekspresji tego czynnika w postępie choroby nerek.

Drugim biomarkerem, któremu postanowiła się przyjrzeć Doktorantka jest 2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO-1), enzym wytwarzany przez komórki w odpowiedzi na stan zapalny. Naturalny immunosupresant, zmniejszający odpowiedź limfocytów m.in. poprzez zmniejszenie stężenia tryptofanu. Istnieją przesłanki, że zmniejszenie stężenia IDO-1 może hamować procesy włóknienia w nerkach, a jednocześnie być niezależnym czynnikiem wpływającym na eGFR i stosunek albuminuria/kreatynina i może być stosowany jako biomarker do oceny postępu przewlekłej choroby nerek. Wykazano jednak, że w toczniowym zapaleniu nerek zmniejszenie ekspresji tego enzymu może prowadzić do zaostrzenia choroby. Nie można więc traktować tego czynnika jako uniwersalnego dla wszystkich glomerulopatii, a jego zachowanie nie zostało jeszcze zbadane u chorych z FSGS.

Wstęp stanowi dobre podłoże do wyjaśnienia założeń i celów pracy oraz wyboru tych dwóch czynników jako biomarkerów FSGS.

Cele pracy w postaci 5 punktów sformułowane są jasno i zachęcają klinicystę do prześledzenia wyników, gdyż zmierzają się nie tylko z oceną znaczenia prognostycznego ekspresji tkankowej białek PARP-1 i IDO-1 dla progresji niewydolności nerek u pacjentów z FSGS, ich znaczenia w różnicowaniu pomiędzy pierwotną oraz wtórną postacią choroby, charakterem i nasileniem zmian w bioptacie nerki, ale i z aspektami klinicznymi takimi jak np. nasilenie białkomoczu. Doktorantka postanowiła ponadto zbadać czynniki kliniczne i parametry histopatologiczne prognozujące przebieg kliniczny pierwotnego i wtórnego FSGS, a także zbadać związek między zmianami histopatologicznymi, a czynnością nerek w czasie biopsji.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera wyczerpujące informacje na temat metod badawczych użytych w pracy. Realizacji postawionych celów posłużyło retrospektywne badanie przeprowadzone wśród 52 chorych pozostający pod opieką Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu, u których w latach 2012-2018r. w wykonanej biopsji nerki stwierdzono uszkodzenie kłębuszków o typie FSGS. Badania immunohistochemiczne, celem wykrycia analizowanych biomarkerów (białka



PARP-1 i IDO-1), zostały wykonane z użyciem archiwalnych bloczków parafinowych. Analizie poddano ekspresję badanych biomarkerów w tkance nerkowej w odniesieniu do retrospektywnych klinicznych i laboratoryjnych wykładników postępu przewlekłej choroby nerek. Analizie podlegały także czynniki demograficzne takie jak: wiek, płeć, parametry antropomorficzne, dane kliniczne, w tym odpowiedź na wstępną terapię oraz całościowe stosowane leczenie. Co warto podkreślić parametry kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych zostały przeanalizowane w trzech punktach czasowych: w momencie biopsji, po roku od jej wykonania oraz dodatkowo analizie poddano wskaźniki wieloletniego przeżycia nerek (do stycznia 2023). Warto podkreślić długi czas obserwacji któremu poddani byli chorzy, wyniósł średnio  $76,9 \pm 30,3$  miesięcy. Ciekawe jest prześledzenie zachowania się markerów systemowej odpowiedzi zapalnej, na podstawie danych z automatycznego rozmazu krwi obwodowej u chorych z FSGS. Szczegółowo przedstawione są również kryteria oceny histopatologicznej wg. których Doktorantka będzie dokonywała porównań zarówno ekspresji ocenianych markerów jak również zależności kliniczno- laboratoryjne. Z obowiązku recenzenta: konieczne byłoby podanie jednostek dla UPCR (str. 25) oraz uzupełnienie numeru zgody Komisji Bioetycznej na wykonanie badania.

Wyniki wielokierunkowej skomplikowanej statystycznie analizy zebranych oznaczeń zostały opisane bardzo szczegółowo i precyzyjnie oraz przedstawione w postaci przejrzysto skonstruowanych 39 tabel oraz 17 rycin (w tym 8 fotografii).

Do badania zakwalifikowano 52 chorych w tym 35 (67,3%) z rozpoznaniem pierwotnego oraz 17 (32,7%) wtórnego FSGS. Wskazane byłoby uzupełnienie informacji jaka była etiologia wtórnego FSGS w analizowanych przypadkach. U 2 osób stwierdzono obecność przeciwciał ANA, czy tych chorych traktowano jako wtórny FSGS? Co prawda Doktorantka wymienia choroby współistniejące u analizowanych chorych, ale nie jest jasne czy np. otyłość we wszystkich przypadkach była traktowana jako przyczyna wtórnego czy też jako choroba współistniejąca w pierwotnym FSGS. Bardzo ciekawe i przydatne klinicznie jest przedstawienie charakterystyki pacjentów z pierwotnym i wtórnym FSGS pod względem ocenianych parametrów laboratoryjnych, zwłaszcza białkomoczu, czynności nerek oraz pozostałych ocenianych parametrów biochemicznych.

Warto podkreślić że badania histopatologiczne zostały wykonane na podstawie reprezentatywnych biopsji, gdyż średnio bioptyaty zawierały 16,5 kłębuszków. Istotne z punktu klinicznego jest przedstawienie analizy zależności występowania zmian kłębuszkowych ze



zmianami śródmiąższowo-cewkowymi u zbadanych chorych, zwłaszcza że jak już zaznaczono wcześniej, ocena histopatologiczna bioptatów podlegała bardzo ścisłym kryteriom i była bardzo wnikliwa. Bardzo ciekawe pod względem klinicznym są obserwowane korelacje między zmianami histopatologicznymi stwierdzanymi w bioptatach, a ocenianymi parametrami klinicznymi. Należy podkreślić jasny i klarowny sposób przedstawienia zależności klinicznych i histopatologicznych w formie przejrzystych tabel, co powoduje że zawite wyniki stają się przejrzyste i czytelne. Dość zaskakujące jest, że nie stwierdzono istotnej różnicy w parametrach oceny histopatologicznej kłębuszków, śródmiąższu ani arteriolosklerozy między grupami pacjentów bez białkomoczu, z białkomoczem o mniejszym nasileniu oraz z białkomoczem nerczycowym (zespołem nerczycowym). U 21 pacjentów doszło do postępu choroby do ESKD, przy czym częściej we wtórnym FSGS (73%) niż pierwotnym (31%), zaś pacjenci z pierwotnym FSGS charakteryzowali się dłuższym zachowaniem czynności nerek. Czynność nerek w chwili biopsji nerki oraz wielkość białkomoczu we wtórnym FSGS okazały się w najbardziej rokowniczo istotnymi parametrami. Innym ciekawym wynikiem odnotowanym w badaniach Doktorantki jest brak istotnego statystycznie wpływu stosowania ACEI na zachowanie czynności nerek, zwłaszcza że dotychczasowe dane literaturowe dotyczące blokowania układu RAS i progresji PChN przemawiają za ich nefroprotekcijnym działaniem, choć część badaczy, podobnie jak w ocenianej dysertacji, nie wykazała takiego wpływu. Natomiast oceniane biomarkery nie były skorelowane ze zmianami kłębuszkowymi, okazały się nieistotne jeżeli chodzi o różnicowanie pierwotnego z wtórnym FSGS natomiast ekspresja PARP-1 iIDO-1 w nacieku zapalnym w śródmiąższu miała istotny związek z wystąpieniem schyłkowej niewydolności w długotrwałej obserwacji.

W dyskusji Doktoranta przedstawia swoje wyniki i obserwacje na tle dobrze dobranych i aktualnych doniesień. Doktorantka podkreśla, że ekspresja PARP-1 w śródmiąższowym nacieku zapalnym ponad dwukrotnie zwiększała ryzyko niewydolności nerek, a obecność ekspresji drugiego z biomarkerów tj. IDO-1 w śródmiąższowym nacieku zapalnym podnosiła prawie 3-krotnie to ryzyko. W dyskusji Doktorantka przedstawia swoje wyniki i analizuje udział białka PARP-1 w patogenezie uszkodzenia nerek w tym w procesach włóknienia oraz procesie niedokrwienno-regeneracyjnym. Jednocześnie podkreśla że dokładne wyjaśnienie dylematu sprzecznych danych na temat ekspresji PARP-1 w tkankach i we krwi może mieć kluczowe znaczenie dla określenia szkodliwej lub ochronnej roli tego biomarkera. Trzeba podkreślić, że badania nad rolą drugiego biomarkera, enzymu IDO-1 w FSGS są pionierskie,



co również prezentuje Doktoranta w Dyskusji. W literaturze dostępne są pojedyncze doniesienia opisujące rolę IDO-1 w chorobach nerek u ludzi. Dyskusja napisana jest bardzo rzeczowo i na temat. Czyta się ją z kliniczną ciekawością. Dowodzi dużej dojrzałości lekarz Aleksandry Musiała, widać w niej doskonałą znajomość najnowszego piśmiennictwa dotyczącego prezentowanego zagadnienia. Koleżanka prezentuje poczynione przez siebie obserwacje na tle doniesień innych autorów dokonując trafnej analizy i wyciągając poprawne wnioski. Krytycznie również odnosi się do swoich wyników umieszczając w dysertacji podrozdział „Ograniczenia badania”. Zwraca uwagę czytelnika na brak badań mikroskopii elektronowej, małą liczebność grupy badanej – choć dużą jak na badanie jednoosrodkowe oraz z długim okresem follow-up. Słusznie zauważa również, że część biopsji wykonywana była w trakcie leczenia immunosupresyjnego co może wpłynąć na ekspresję badanych biomarkerów, a także że ekspresja ta była oceniana na poziomie tkankowym, bez oznaczeń stężeń biomarkerów we krwi. Świadomość ograniczeń swoich badań świadczy o dojrzałości naukowej badacza.

Wszystkie najistotniejsze obserwacje z przeprowadzonych analiz Autorka umieszcza w postaci 5 bardzo istotnych klinicznie wniosków końcowych. Są one konsekwentną i jasną odpowiedzią na założone cele, logicznie wynikają z omówienia przeprowadzonych analiz i znajdują w nich pełne uzasadnienie.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Aleksandry Musiała spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)” wymagane na stopień doktora nauk medycznych. Doktorantka podjęła ważny z punktu widzenia naukowego ale i klinicznego temat badawczy, sformułowała interesujące cele pracy, zastosowała właściwe metody umożliwiające ich realizację oraz wykazała umiejętność wszechstronnej analizy uzyskanych wyników w świetle aktualnej wiedzy i właściwego wnioskowania.

Przedstawiam zatem, Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Aleksandry Musiała do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc ponadto pod uwagę staranność i wszechstronność przeprowadzonej analizy materiału badawczego, wartość naukową podjętego tematu oraz istotne implikacje kliniczne uzyskanych wyników, z wielką przyjemnością wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. n med. Ilona Kurnatowska

