



Recenzja pracy doktorskiej lek. Aleksandry Musiała  
**„Biomarkery ogniskowego i segmentalnego kłębuszkowego zapalenia nerek  
(FSGS) w optymalnej strategii diagnostyczno-terapeutycznej”**

Ogniskowe i segmentalne stwardnienie kłębuszków (FSGS, ang. *focal segmental glomerulosclerosis*) jest chorobą związaną z uszkodzeniem podocytów, charakteryzującą się ogniskową i segmentalną sklerotyzacją pętli włosniczkowych kłębuszków nerkowych. Wśród osób dorosłych, FSGS jest drugim najczęstszym rozpoznaniem w biopsji nerki. Choroba ta manifestuje się białkomoczem o różnym nasileniu, od niewielkiego do zespołu nerczycowego z nasilonymi obrzękami i hipoalbuminemią. U części chorych występuje krwinkomocz, nadciśnienie tętnicze lub upośledzenie czynności nerek.

Wyróżnia się FSGS: pierwotne, wtórne, uwarunkowane genetycznie oraz o nieustalonej etiologii. Wtórny FSGS jest rozpoznawane częściej niż pierwotne, a jego przyczynami są: zmiany adaptacyjne związane z hiperfiltracją kłębuszków nerkowych lub uszkodzenia podocytów wywołane m.in. przez toksyczność leków lub zakażeniami wirusowymi. Genetycznie uwarunkowany FSGS może być ograniczony do nerek lub być częścią zespołów genetycznych z zajęciem wielu narządów. Różnicowanie pomiędzy pierwotnym i wtórnym charakterem FSGS odbywa się na podstawie przebiegu choroby oraz po wykluczeniu wtórnego uszkodzenia

Dotychczas nie ustalono etiologii pierwotnego FSGS. Przypuszcza się, że za powstanie tej choroby odpowiadają rozpuszczalne, niezidentyfikowane czynniki, które prowadzą do uszkodzenia podocytów, z zatarciem wyrostków stopowatych podocytów i białkomoczem. Wiadomo, że antygeny zlokalizowane na podocytach mogą odgrywać rolę w inicjacji i postępu zmian obserwowanych w FSGS.

U większości chorych z pierwotnym FSGS występuje zespół nerczycowy. Pacjenci z białkomoczem nienerczycowym charakteryzują się lepszym rokowaniem w porównaniu do

pacjentów z białkomoczem nerczycowym. U chorych z białkomoczem nerczycowym może dojść do rozwoju schyłkowej przewlekłej choroby nerek w ciągu 5–10 lat.

Dwa immunopatologiczne wskaźniki poddane analizie w ocenianej pracy tj. polimeraza poli(ADP-rybozy) 1 (PARP-1) i 2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO-1) mogą być potencjalnymi nowymi wskaźnikami rokowniczymi w FSGS.

Polimeraza poli(ADP-rybozy) 1 (PARP-1) jest białkiem jądrowym, które reguluje ekspresję genów, jako koaktywator transkrypcji i czynność białek poprzez poli(ADP-rybozylację). Poli ADP-rybozylacja wywiera wpływ na czynność białek jak i uczestniczy w naprawie uszkodzonego DNA i tym samym pozwala utrzymać integralność genomu. W badaniach na zwierzętach doświadczalnych myszach z kłębuszkowymi zapaleniami nerek (KZN) (toczniowym oraz anty-GBM), wykazano, że PARP-1 jest aktywowany w przebiegu kłębuszkowego zapalenia nerek, a farmakologiczne hamowanie jego aktywności powoduje zmniejszenie reakcji zapalnej i rozległości zmian martwiczych oraz poprawia przeżycie. Nie ma opublikowanych badań dotyczących korelacji między aktywnością PARP-1 a przebiegiem klinicznym FSGS.

2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO-1) jest enzymem cytoplazmatycznym, biorącym udział w metabolizmie tryptofanu. Jest on wytwarzany przez komórki w odpowiedzi na stan zapalny i wywiera działanie immunosupresyjne oraz pobudza mechanizmy tolerancji immunologicznej. W badaniach na zwierzętach doświadczalnych z autoimmunologicznym KZN wykazano, że IDO-1 przyspiesza postęp choroby oraz pobudza powstawanie KZN z tworzeniem półksiężyców. Dotychczas nie przeprowadzono badań dotyczących wpływu IDO-1 na rozwój i postęp FSGS.

Tematem recenzowanej rozprawy są badania nad znaczeniem czynników klinicznych i parametrów histopatologicznych, w tym ekspresji tkankowej białek PARP-1 i IDO-1, w różnicowaniu pomiędzy pierwotnym a wtórnym FSGS, oraz w prognozowaniu przebiegu klinicznego FSGS. Należy mieć nadzieję, że przeprowadzanie badań podobnych do analiz będących treścią rozprawy, pozwoli na lepsze zrozumienie patogenezy FSGS oraz roli różnych cząsteczek w patologii uszkodzenia podocytów, co może prowadzić do wdrożenia nowych metod leczenia tej choroby ukierunkowanego na etiologię.

Przedstawiona mi do oceny praca ma typowy układ. Liczy 104 strony, w tym 17 rycin i 39 tabel. Pod koniec pracy po *Wnioskach* zamieszczone zostały streszczenia w języku polskim i angielskim. Spis dobrze dobranego, aktualnego i właściwie przytoczonego



piśmiennictwa (147 pozycji) jest zamieszczony na końcu pracy. Forma edytorska pracy z wyraźnym podziałem poszczególnych rozdziałów na podrozdziały niewątpliwie ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z treścią dysertacji.

W obszernym, ciekawie napisanym *Wstępie* Doktorantka wprowadziła czytelnika w tematykę pracy zamieszczając szczegółowe informacje dotyczące ogniskowego i segmentalnego stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS). Scharakteryzowała przyczyny oraz cechy kliniczne poszczególnych postaci tej choroby tj. pierwotnego FSGS, wtórnego FSGS, uwarunkowanego genetycznie FSGS i FSGS o nieustalonej przyczynie. Autorka podała w formie tabelarycznej i omówiła w tekście rozprawy klasyfikację FSGS wg. *Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO)*. Następnie zamieściła podstawowe informacje dotyczące leczenia FSGS. W kolejnej części *Wstępu* rozprawy doktorskiej Doktorantka przedstawiła dane dotyczące dwóch kandydatów na biomarkery, których aktywność podlega ocenie w biopsjach nerki, a będących przedmiotem szczegółowej analizy w pracy doktorskiej tj. polimerazy poli(ADP-rybozy) 1 (PARP-1) oraz 2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO-1). Strukturę tych biomarkerów przedstawiono na 2 rycinach. *Wstęp* został zakończony omówieniem, innych wybranych biomarkerów FSGS o bardziej ustalonym znaczeniu klinicznym. Część z nich może być wykorzystana jako czynnik prognostyczny schyłkowej niewydolności nerek w FSGS, a część pozwala różnicować FSGS z innymi glomerulopatiami. Zestawienie tych biomarkerów zostało umieszczone w jednej z tabel. *Wstęp* rozprawy doktorskiej jest starannie napisany i dowodzi szerokiej wiedzy Doktorantki. Informacje podane w nim są odpowiednio usystematyzowane, są szczegółowe i wyczerpujące. Jest on wzbogacony 3 tabelami w sposób syntetyczny przedstawiającymi omawiane zagadnienia.

Po *Wstępie* rozprawy doktorskiej Doktorantka zamieściła rozdział *Cel pracy*. W tym krótkim rozdziale Autorka uzasadniła w sposób zwięzły celowość przeprowadzonych badań. Wymienionymi przez Doktorantkę celami pracy doktorskiej były: określenie znaczenia prognostycznego ekspresji tkankowej białek PARP-1 i IDO-1 dla progresji niewydolności nerek u pacjentów z FSGS oraz dla różnicowania pomiędzy pierwotnym a wtórnym FSGS, określenie związku pomiędzy ekspresją tkankową PARP-1 i IDO-1 oraz parametrami oceny histopatologicznej biopsjatu, a nasileniem białkomoczu w okresie okołobiopsyjnym jak również określenie czynników klinicznych i parametrów histopatologicznych prognozujących przebieg kliniczny pierwotnego i wtórnego FSGS oraz określenie związku między parametrami oceny histopatologicznej, a czynnością nerek w okresie okołobiopsyjnym.

Podjęty przez lek. Aleksandrę Musiała temat porusza istotne i jak dotąd w niewystarczającym stopniu zbadane zagadnienia dotyczące patofizjologii i diagnostyki chorych z FSGS i jest nadzwyczaj trafny, z punktu widzenia poznawczego, jak i mogący mieć istotne implikacje kliniczne.

Jak to przedstawiono w rozdziale *Metody*, badanie kliniczne, którego wyniki są przedmiotem pracy doktorskiej miało charakter badania retrospektywnego, obserwacyjnego. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Niestety w pracy doktorskiej Doktorantka nie podała numeru i daty zgody Komisji Bioetycznej.

Do badania, którego wyniki są przedmiotem pracy doktorskiej, zakwalifikowano 52 chorych z potwierdzonym histopatologicznie uszkodzeniem kłębuszków o typie FSGS, u których biopsję ze wskazań klinicznych wykonano w latach 2012-2018. W pracy oceniano parametry uzyskane w biopsji nerki w kontekście obrazu klinicznego i przebiegu choroby.

Ocenę histopatologiczną bioptatów nerek przeprowadzono przy pomocy metod rutynowo stosowanymi w nefropatologii. Patomorfologiczną i immunopatologiczną ocenę bioptatów przeprowadzono w oparciu o uprzednio zdefiniowane w pracy kryteria. Analizą tą objęto: kłębuszki nerkowe, naczynia tętnicze, oraz śródmiąższ nerki. Wykonano ponadto badania immunohistochemiczne oraz ocenę immunopatologiczną ekspresji PARP-1 i IDO-1 w bioptatach nerki.

Obraz kliniczny i przebieg choroby analizowano w oparciu o dokumentację medyczną zgromadzoną w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Do badania wykorzystano dane archiwalne oraz dane gromadzone w trakcie prowadzenia obserwacji. Obserwacje były prowadzone od czasu biopsji, w której rozpoznano FSGS do czasu utraty funkcji nerek lub do stycznia 2023 w przypadku chorych, którzy nie wymagali leczenia nerkozastępczego. Dlatego czas obserwacji chorych był bardzo zróżnicowany i wynosił od 8 do 132 miesięcy. Analizie poddano wyniki rutynowych badań laboratoryjnych: morfologii krwi, stężenia albumin, białka, kreatyniny stężenie cholesterolu całkowitego, bilirubiny całkowitej, mocznika, kwasu moczowego, i CRP w osoczu a także OB. Analizowano ponadto wyniki badań ogólnych moczu. Oszacowano eGFR i wyliczono stosunek białkomoczu do kreatyninurii. Powyższe badania wykonano w okresie okołobiopsyjnym, rok po nim, oraz do czasu utraty funkcji nerek lub końca obserwacji. W pracy wykorzystano wyłącznie wyniki badań laboratoryjnych wykonywane ze wskazań klinicznych.



Do opisu przebiegu choroby wykorzystano definicje według KDIGO a dotyczące: remisji całkowitej, remisji częściowej, zmiany nasilenia białkomoczu, aktywnego osadu moczu i pogorszenie czynności nerek (określanego jako zmniejszenie eGFR o 25% w stosunku do wartości na początku badania lub rozpoczęcie dializoterapii).

Ponadto na podstawie wyniku badania histopatologicznego bioptatu nerki, przebiegu choroby, informacji uzyskanych z wywiadu oraz po ewentualnym ustaleniu wtórnej przyczyny glomerulopatii przeprowadzono różnicowanie pomiędzy pierwotnym a wtórnym FSGS.

Metodyka badań i metody analizy statystycznej nie budzą istotnych zastrzeżeń i zostały przedstawione w rozdziale *Metody* w sposób wyczerpujący. Na uwagę zasługują fakt przeprowadzenie licznych wielokierunkowych badań wykonanych przy użyciu zarówno patomorfologicznych jak i laboratoryjnych.

W rozdziale *Wyniki* Autorka prezentuje w sposób uporządkowany uzyskane wyniki. Wyniki wielokierunkowej analizy zebranych danych zostały przedstawione bardzo starannie. Liczne tabele (w liczbie 39) oraz ryciny (w liczbie 17; w tym 8 fotografii) niewątpliwie ułatwiają czytelnikowi zapoznanie się z treścią tego rozdziału dysertacji. Na początku rozdziału *Wyniki* Doktorantka przedstawiła charakterystykę demograficzną i kliniczną grupy badanej, a następnie dokonała porównania parametrów klinicznych i morfologicznych pomiędzy chorymi z pierwotnym i wtórnym FSGS. Spośród 52 analizowanych chorych u 35 (67,3%) rozpoznano pierwotny a u 17 (32,7%) wtórny FSGS. W tym miejscu brakuje analizy przyczyn wtórnego FSGS. Taka analiza uwzględniając złożoność zagadnienia byłaby niewątpliwie mało precyzyjna i nie definitywna. Tym niemniej, dałaby pogląd czytelnikowi na możliwe przyczyny wtórnego FSGS u chorych poddanych analizie w bieżącej pracy. Ponadto u chorych objętych badaniem, w odróżnieniu od prac innych autorów, jak to Autorka nadmieniła we *Wstępie* pracy, częściej stwierdzano pierwotny niż wtórny FSGS. Fakt ten niestety Doktorantka pozostawiła bez komentarza. W pracy stwierdzono m.in. że chorzy z pierwotnym i wtórnym FSGS różnili się pod względem stężeń następujących parametrów w surowicy krwi: albuminy, białka całkowitego, cholesterolu całkowitego, a także pod względem białkomoczu dobowego, co ilustruje dobrze znany fakt rzadszego występowania zespołu nerczycowego u chorych z wtórnym FSGS. Ciekawe i oryginalne jest przedstawienie zmian, w trakcie obserwacji, wskaźników odpowiedzi zapalnej uzyskanych z automatycznego rozmazu krwi obwodowej. Porównując parametry oceny histopatologicznej bioptatów u chorych z pierwotnym i wtórnym FSGS nie wykazano istotnych różnic za wyjątkiem odsetka zanikłych cewek.

W kolejnej części rozdziału *Wyniki* Doktorantka przedstawiła analizę związków pomiędzy poszczególnymi parametrami badania histopatologicznego bioptatów nerek, stwierdzając występowanie związku pomiędzy nasileniem zmian w kłębuszkach nerkowych i śródmiąszu nerki. Następnie Doktorantka przedstawiła analizę związków pomiędzy parametrami klinicznymi a poszczególnymi parametrami badania histopatologicznego bioptatów nerek. Stwierdziła różnicę między chorymi z upośledzeniem czynności nerek w okresie okołobiopsyjnym, a chorymi z prawidłową czynnością nerek w odniesieniu do odsetka niezmiennych kłębuszków, który był większy u chorych z prawidłową czynnością nerek. Równocześnie obserwowano mniejszy odsetek kłębuszków z całkowitą sklerotyzacją w bioptatach chorych z prawidłową czynnością nerek. Chorzy z upośledzoną czynnością nerek mieli wyższy odsetek powierzchni objętej włóknieniem w obrębie śródmiąszu i bardziej nasilony zanik cewek oraz częstsze występowanie arteriolosklerozy. Zaskakującą i trudną do wytłumaczenia obserwacją jest nie stwierdzenie różnicy w parametrach oceny histopatologicznej kłębuszków i śródmiąszu u chorych z różnym nasileniem białkomoczu.

W kolejnej części rozdziału *Wyniki* Doktorantka przedstawiła analizę ekspresji PARP-1 i IDO-1 w bioptatach nerek w pierwotnym i wtórnym FSGS jak i analizą zaawansowania zmian histopatologicznych FSGS w zależności od ekspresji PARP-1 i IDO-1 w biopsjach nerek. Doktorantka nie stwierdziła różnic pod względem intensywności ekspresji PARP-1 i IDO-1 w poszczególnych kompartmentach bioptatów nerek u chorych z pierwotnym i wtórnym FSGS. Nie stwierdziła również różnicy pomiędzy nasileniem intensywności reakcji immunohistochemicznej dla PARP-1 i IDO-1 a cechami morfologicznymi kłębuszków nerkowych, włóknieniem miąszu, zanikiem cewek. Wykazała natomiast występowanie związku między nasileniem zapaleniem cewkowo-śródmiąszowym o charakterze przewlekłym w obrębie śródmiąszu a nasileniem ekspresji PARP-1 i IDO-1 w śródmiąszowym nacieku zapalnym. Wyniki dotyczące ekspresji PARP-1 i IDO-1 zostały zilustrowane reprezentatywnymi zdjęciami mikroskopowymi preparatów nerek. Zdjęcia te są wysokiej jakości a ich dobry wybór jednoznacznie wskazuje na biegłość doktorantki w analizie obrazów mikroskopowych.

Na uwagę zasługuje stwierdzenie lepszego rokowania u chorych z pierwotnym FSGS w porównaniu do chorych z wtórnym FSGS. Wynik ten może zaskakiwać, bo chorzy z pierwotnym FSGS mają bardziej nasilone cechy zespołu nerczycowego w porównaniu do chorych z wtórnym FSGS.



W ostatniej części rozdziału *Wyniki* Doktorantka przedstawiła analizę czynników prognozujących czynność nerek u chorych z FSGS stwierdzając, że przeżycie nerek związane było z nasileniem zmian w śródmiąższu nerek, nasileniem włóknienia i zaniku cewek, odsetkiem nasilonej sklerotyzacji kłębuszków a także w ekspresją PARP-1 oraz IDO-1. Na uwagę zasługuje fakt, że stwierdzenie ekspresji PARP-1 w śródmiąższowym nacieku zapalnym ponad dwukrotnie zwiększało ryzyko niewydolności nerek, a wykazanie ekspresji IDO-1 w śródmiąższowym nacieku zapalnym ponad trzykrotnie zwiększało to ryzyko.

Dyskusja jest poprowadzona bardzo szeroko i skrupulatnie. Rozdział ten zawiera rzeczową i samodzielną interpretację wyników, a Doktorantka skonfrontowała własne wyniki z rezultatami uzyskanymi przez autorów innych prac. W tej części dysertacji Autorka przedstawiła wyniki uzyskane w badaniu będącym treścią rozprawy doktorskiej i analizuje udział białka PARP-1 w patogenezie chorób nerek. Na dojrzałość badawczą Doktorantki wskazują treść podrozdziału *Ograniczenia badania*. Krytycznie spoglądając na ograniczenia badania będącego treścią pracy doktorskiej Autorka podkreśla brak przeprowadzenia oceny bioptatów nerek w mikroskopii elektronowej. Przeprowadzenie i analiza ilościowa wyników takiej oceny mogłaby niewątpliwie ułatwić różnicowanie pomiędzy pierwotnym i wtórnym FSGS. Kolejnymi ograniczeniami pracy, słusznie wymienionymi przez Doktorantkę są: niewielką liczbę chorych objętych badaniem, jak i wykonywanie u części chorych badań bioptycznych podczas leczenia immunosupresyjnego. Te ograniczenia badania nie mają jednak charakteru bezwzględny. W badaniu przeprowadzonym w jednym ośrodku trudno w określonym czasie zgromadzić większą liczbę chorych na jedną ze specyficznych patologii kłębuszkowych jak jest FSGS. Podobnie ewentualne wykluczenie z badania chorych u których zastosowano przed wykonaniem biopsji nerki leczenie immunosupresyjne zmniejszyło by istotnie liczbę analizowanych chorych, co być może uniemożliwiło by wręcz przeprowadzenia analiz będących treścią badania.

Rozprawę kończy 5 wniosków, których treść jest zgodna z celami pracy. Treść tych wniosków logicznie wynika z analiz wyników uzyskanych w badaniu będącym treścią rozprawy doktorskiej.

*Piśmiennictwo* obejmuje prace do 2023 roku, które są prawidłowo dobrane i odpowiednio cytowane w tekście.

W tekście rozprawy Doktorantka nie ustrzegła się nielicznych drobnych błędów edytorskich. W kilku miejscach w dysertacji (m.in. w rozdziale *Metody*) nie podano jednostek

stosunku białkomoczu do kreatyninurii (UPCR). W tabeli 4-3 zastosowano skrót EGFR (co może sugerować *epidermal growth factor receptor*) zamiast poprawnego skrótu eGFR.

Oceniając pracę, należy podkreślić umiejętność skonfrontowania własnych wyników z danymi literaturowymi. Praca jest dobrym opracowaniem odpowiednio dobranego materiału klinicznego z zastosowaniem adekwatnych narzędzi badawczych. Ponadto rozprawa została bardzo dobrze opracowana pod względem edytorskim.

Autorka dowiodła zdolności prowadzenia oryginalnych badań klinicznych oraz wykazała się dobrym przygotowaniem merytorycznym i umiejętnością samodzielnego formułowania i rozwiązywania problemów naukowych.

Kończąc pragnę jeszcze raz podkreślić istotne walory poznawcze wykonanych badań. Za najważniejsze osiągnięcie badawcze ocenianej rozprawy należy uznać wykazanie przez Doktorantkę, znacznego zwiększenia ryzyka schyłkowej niewydolności nerek u chorych z FSGS u których stwierdza się ekspresję PARP-1 jak i IDO-1 w śródmiąższowym nacieku zapalnym.

W podsumowaniu recenzji, 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. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Marcin Adamczak

Prof. dr hab. n. med. Marcin Adamczak  
Specjalista chorób wewnętrznych  
Nefrolog  
Specjalista hipertensjolog