



I Klinika Nefrologii i Transplantologii z Ośrodkiem Dializ Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Białystok 2019, 12, 16

Ocena rozprawy doktorskiej

Lekarz Dagny Rukasz

„Rola przeciwciał anti-PLA2R w glomerulopatiach”

Choroby kłębuszków nerkowych (glomerulopatie) to niejednorodna grupa chorób nerek. Są to choroby zapoczątkowane w kłębuszkach nerkowych, zajmujące następnie inne struktury nerek i czasem prowadzące do zmian ogólnoustrojowych. Choroby kłębuszków nerkowych są istotnym problemem w nefrologii. Patogeneza glomerulopatii jest niezwykle złożona, a czynniki etiologiczne w zasadzie nieznane. Uogólniając można przyjąć, że mechanizmem w większości glomerulopatii zarówno pierwotnych, jak i wtórnych jest mechanizm immunologiczny, w wyniku którego dochodzi do uszkodzenia kłębuszka. Kłębuszkowe zapalenia nerek (KZN) to najczęściej występujące glomerulopatie charakteryzujące się zajęciem przez proces zapalny kłębuszków nerkowych, co z kolei prowadzi do nieprawidłowej pracy nerek, a w dalszym przebiegu często do ich schyłkowej niewydolności.

W większości przypadków nie można na podstawie obrazu klinicznego rozpoznać charakteru i nasilenia zmian morfologicznych w kłębuszkach ani stopnia ich uszkodzenia, gdyż na podłożu bardzo zbliżonych zmian histopatologicznych mogą występować różne postaci kliniczne. Ponadto w różnych okresach określonego typu KZN może występować różny obraz, co jest wynikiem różnej aktywności choroby, a niekiedy przechodzenia lub nakładania się jednego typu KZN na inny. Z tych powodów podział KZN opiera się na obrazie histopatologicznym, gdyż wskazuje on na patomechanizm KZN oraz charakter uszkodzenia struktur nerki, co ma decydujące znaczenie dla wyboru sposobu leczenia i określenia rokowania. Większość typów KZN może być glomerulopatią pierwotną albo wtórną i przebiegać pod różnymi postaciami klinicznymi.

Błoniaste kłębuszkowe zapalenie nerek jedna z najczęstszych postaci KZN rozwija się wskutek uszkodzenia błony podstawnej kłębuszków przez kompleksy immunologiczne, co jest przyczyną białkomoczu. Postać pierwotna występuje w 70–75% wszystkich przypadków nefropatii błoniastej. U 70–80% chorych występują krążące autoprzeciwciała przeciwko receptorowi dla fosfolipazy A₂, a u 8–14% autoprzeciwciała przeciwko trombospondynie. Przyczyny postaci wtórnych to: nowotwory, głównie guzy lite (rak płuca, żołądka lub jelita grubego), toczeń rumieniowaty układowy, zakażenie HBV i HCV, leki, sarkoidoza.

Na podstawie obrazu histopatologicznego wycinka nerki nie można pewnie odróżnić pierwotnego od wtórnego błoniastego KZN.

Odkrycie autoprzeciwciał przeciwko receptorowi fosfolipazy A₂ 1 (PLA₂R) uważane jest za kamień milowy w diagnostyce glomerulopatii. Są one pierwszym opisanym markerem serologicznym pierwotnej nefropatii błoniastej, a ich wartość w diagnostyce nefropatii błoniastej stała się ostatnio przedmiotem wielu publikacji.

Zgodnie z piśmiennictwem, przeciwciała anty-PLA₂R odgrywają ważną rolę w patogenezie pierwotnej nefropatii błoniastej. Oprócz różnicowania pierwotnej nefropatii błoniastej od wtórnej ocena miana anty-PLA₂R może służyć jako marker prognostyczny do oceny i monitorowania przebiegu choroby i leczenia. Wysokie miano są związane z ciężkim przebiegiem pierwotnej nefropatii błoniastej, która wymaga bardziej intensywnej terapii. U pacjentów leczonych lekami immunosupresyjnymi miano na ogół szybko maleje – poprzedzając spadek białkomoczu. Szansa na powodzenie leczenia i remisję choroby jest wyższa, jeśli początkowe miano przeciwciał anty-PLA₂R było niskie.

Dotychczasowe badania wskazują, że przeciwciała anty-PLA₂R posiadają wysoką wartość diagnostyczną dla pierwotnej nefropatii błoniastej. Wydaje się, że oznaczanie miana przeciwciał anty-PLA₂R umożliwia ocenę i przewidywanie aktywności choroby, niezbędne środki terapeutyczne i szansę powodzenia terapii.

Badania nad układem immunologicznym w wielu aspektach chorób nerek, a przede wszystkim w glomerulopatiach są sztandarowym celem badań ośrodka nefrologicznego we Wrocławiu. Doktorantka recenzowanej pracy pochodzi właśnie z tej Uczelni i temat pracy doktorskiej jak najbardziej wpisuje się w działalność naukową Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Doktorantka za cel swojej pracy obrała: określenie wartości oznaczeń przeciwciał anty-PLA₂R w surowicy jako markerów pierwotnego błoniastego kłębuszkowego zapalenia nerek w materiale Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej we Wrocławiu; porównanie oznaczeń

przeciwciał anty-PLA2R w surowicy wykonywanych metodą immunofluorescencji pośredniej oraz testem ELISA w grupie pierwotnej glomerulopatii błoniastej; ocena zależności oznaczeń przeciwciał anty-PLA2R w surowicy krwi i aktywności pierwotnego błoniastego zapalenia nerek; oszacowanie występowania złogów antygeny PLA2R i IgG4 w biopsji nerek pacjentów z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej; określenie zależności pomiędzy natężeniem reakcji immunohistochemicznej nerkowych złogów PLA2R i IgG4 a aktywnością błoniastego zapalenia nerek; ocena diagnostycznej przydatności wykonywania oznaczeń przeciwciał anty-THSD7A w surowicy.

Cele pracy są szerokie, jak najbardziej warte podjętych badań, gdyż ocena markerów, mających wpływ na rozpoznanie i ocenę skuteczności leczenia kłębuszkowych zapaleń nerek jest niezwykle ważne i jest jednym z najważniejszych zadań potrzebnych do skutecznego leczenia chorych z glomerulopatiami. Glomerulopatia błoniasta stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zespołu nerczycowego u dorosłych. Rokowanie odległe zależne jest od uzyskania remisji. Choroba występuje w postaci pierwotnej oraz w postaci wtórnej, pojawiając się w przebiegu różnych chorób ogólnoustrojowych co często jest trudne do ustalenia. Uważam, że cel przedstawionej mi do recenzji pracy jest istotny klinicznie.

Przedstawiona mi do oceny praca ma typowy układ, jest bardzo obszerna, liczy 123 stron, 32 tabel i 26 ryciny, 3 fotografie, cytuje 96 pozycji piśmiennictwa, głównie anglojęzycznego z ostatnich lat dotyczącego badanych zagadnień. Praca jest zaplanowana i przeprowadzona prawidłowo. Wstęp uzasadnia celowość podjętych badań. Materiał i metody badań przedstawione zostały przejrzysto, bardzo dokładnie, co pozwala na powtórzenie badań. W sposób czytelny przedstawiono kryteria włączenia pacjentów do badania. Wyniki są logiczną konsekwencją uzyskanych rezultatów.

Badanie przeprowadzono wśród dorosłych pacjentów w okresie od grudnia 2011 r. do października 2016 r., hospitalizowanych w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu z podejrzeniem kłębuszkowego zapalenia nerek. Do badania włączono pacjentów, którzy wyrazili zgodę na wykonanie diagnostycznej biopsji nerki, a także już wcześniej leczonych pacjentów z potwierdzonym we wcześniejszym okresie rozpoznaniem biopsyjnym glomerulopatii błoniastej. Doktorantka wykonała badania u 50 pacjentów z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej pierwotnej. Grupę badaną stanowiło 30 mężczyzn i 20 kobiet, średni wiek badanych wynosił 54 lata \pm 15 lat (mediana 57 lat). Grupę kontrolną stanowili pacjenci (15) z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej wtórnej oraz wszyscy pozostali pacjenci (138) z innymi typami kłębuszkowych zapaleń nerek. Badania zrealizowano również u 20 zdrowych ochotników.

Rozpoznanie glomerulopatii błoniastej pierwotnej stawiano na podstawie wyniku badania histopatologicznego bioptatu nerki po wykluczeniu wtórnej przyczyny glomerulopatii w badaniach dodatkowych.

Od każdego z uczestników badania w dniu włączenia do badania pobrano 10 ml krwi obwodowej. Próbkę krwi pobierano również w trakcie kolejnych wizyt kontrolnych w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej u wszystkich osób z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej (pierwotnej lub wtórnej) oraz u tych uczestników z grupy kontrolnej, u których po oznaczeniu przeciwciał anti-PLA2R metodą IFA uzyskano wynik dodatni lub niespecyficzną reakcję immunofluorescencji. W grupie zdrowych ochotników krew była pobierana jednokrotnie.

Doktorantka wykonała oznaczenia przeciwciał anti-PLA2R w surowicy zarówno jakościowo jak i ilościowo. Wykonała również ocenę obecności przeciwciał klasy IgG przeciw trombospondynie typu 1. Ocenę histopatologiczną wszystkich dostępnych bioptatów nerki przeprowadzano w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, gdzie wykonano badanie immunohistochemiczne oraz ocenę immunopatologiczną ekspresji antygeny PLA2R i złogów IgG4 w bioptatach nerki. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu odpowiednich do badanych grup testów.

W uzyskanym wyniku doktorantka wykazała w grupie glomerulopatii błoniastej pierwotnej obecność przeciwciał anti-PLA2R u 64% pacjentów, podczas gdy w grupie pacjentów z wtórną nefropatią błoniastą oraz u pacjentów z innymi typami kłębuszkowych zapaleń nerek obecność przeciwciał wykazano jedynie u 6% pacjentów. W grupie zdrowych uczestników obecności przeciwciał nie stwierdziła. Czułość i swoistość obu metod oznaczania przeciwciał anti-PLA2R była wysoka. Wykazała również wysoką zgodność wyników obu testów immunofluorescencji pośredniej (test IFA) oraz ELISA dla oznaczenia przeciwciał anti-PLA2R w surowicy. Stwierdziła, że natężenie reakcji immunofluorescencji pośredniej dla przeciwciał anti-PLA2R oraz badanie stężeniem przeciwciał anti-PLA2R w surowicy oznaczanych testem ELISA korelowało dodatnio z nasileniem białkomoczu, a ujemnie ze stężeniem białka całkowitego oraz albumin w surowicy. Występowanie aktywnego osadu moczu obserwowano częściej, im wyższe było stężenie przeciwciał w surowicy. W przebadanych 32 archiwalnych bioptatach nerek pacjentów z rozpoznaniem pierwotnej MN oraz 8 pacjentów z rozpoznaniem wtórnej nefropatii błoniastej badaniem immunohistochemicznym nie stwierdziła różnic w częstości występowania antygenów PLA2R oraz IgG4 w kłębuszkowych złogach immunologicznych pomiędzy pierwotną a wtórną postacią choroby. W grupie pierwotnej MN wykazano związek pomiędzy nasileniem reakcji immunohistochemicznej dla złogów IgG4 w

kłębuszku nerkowym a stężeniem przeciwciał anti-PLA2R w surowicy oznaczanym testem ELISA. Uzyskane przez doktorantkę wyniki są na ogół zgodne z danymi z piśmiennictwa, jednak część z nich nasuwa konieczność dalszych badań. W badanej grupie doktorantka nie stwierdziła dodatnich wyników oznaczeń anti-THSD7A. Wydaje się, iż wynika to ze zbyt małej grupy badanych chorych, a być może w populacji polskiej stwierdza się te przeciwciała rzadziej.

Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka wysunęła 8 wniosków wynikających z uzyskanych wyników.

1. wyniki oznaczeń przeciwciał anti-PLA2R w surowicy testami immunofluorescencji pośredniej i ELISA w grupie pierwotnej glomerulopatii błoniastej wykazują znaczną zgodność interpretacji;
2. czułość i swoistość obu testów dla oznaczenia przeciwciał anti-PLA2R w procesie rozpoznawania pierwotnej glomerulopatii błoniastej jest wysoka;
3. natężenie przeciwciał anti-PLA2R uzyskane w teście IFA oraz stężenia przeciwciał (test ELISA) korelują z wykładnikami aktywności choroby w pierwotnej glomerulopatii błoniastej;
4. po 24 miesiącach obserwacji białkomocz występuje częściej w grupie pierwotnej z obecnymi w surowicy przeciwciałami anti-PLA2R;
5. po 24 miesiącach obserwacji nie stwierdza się różnicy w ubytku funkcji filtracyjnej nerek w zależności od obecności przeciwciał anti-PLAR w surowicy krwi;
6. obecność złogów IgG4 oraz antygeny PLA2R w kłębuszkowych złogach immunologicznych nie różnicuje pierwotnej i wtórnej glomerulopatii błoniastej w badanej grupie;
7. natężenie reakcji immunohistochemicznej kłębuszkowych złogów IgG4 i PLA2R w badanej grupie nie koreluje z wykładnikami aktywności choroby;
8. w badanej grupie nie stwierdzono dodatnich wyników oznaczeń anti-THSD7A.

Uzyskane wyniki uzyskane dzięki bardzo nowoczesnym badaniom są interesujące, poszerzają naszą wiedzę na temat oceny przydatności badań przeciwciał anti-PLA2r przede wszystkim w nefropatii błoniastej. Mają wartość praktyczną (np. brak lub mała przydatność oznaczania antygeny PLA2R w kłębuszkowych złogach immunologicznych) choć niektóre wymagają jednak potwierdzenie na dużo większej grupie poddanej badaniu i prawdopodobnie zbadaniu jeszcze innych glomerulopatii.

Uwagi recenzenta:

Oceniana rozprawa doktorska nie budzi żadnych zastrzeżeń merytorycznych, a wymienione poniżej uwagi mają przede wszystkim charakter korektorski lub redakcyjny.

W rozdziale wstęp:

W wstępie doktorantka pisze tylko o glomerulopatii błoniastej. Brakuje mi napisania trochę ogólnie o glomerulopatiach bo tytuł brzmi „Rola przeciwciał anti-PLA2R w glomerulopatiach”.

W rozdziałach materiał i metody bardzo obszernie opisanych wydaje mi się, iż można byłoby dokładniej opisać o sposobach leczenia pacjentów (choćby dokładnie to leczenie jest opisane w opisanych przypadkach).

Co do rozdziału wyniki

Zastrzeżeń merytorycznych nie mam ale mam kilka graficznych:

- graficznie w rysunkach 12,14 15 legenda powinna być napisana większą czcionką byłoby to bardziej czytelne
- Rysunek 16 w moim egzemplarzu jest kompletnie niewidoczny jest to jedynie czarny prostokąt

Spis rysunków, tabel oraz piśmiennictwo jest napisane w moim egzemplarzu inną czcionką (mniejszą)

Drobne błędy w piśmiennictwie np. w pozycji 11 jest zły skrót czasopisma Kidney international jest Kidney intern. a nie Kidney Int.

Wnioski są raczej podsumowaniem, łącząc pierwszy i drugi można zastanowić się nad podkreśleniem wysokiej czułości i swoistości oznaczeń niezależnie od rodzaju stosowanego testu, co powinno mieć znaczenia przy ocenie kosztów diagnostyki

Kończąc należy podkreślić nowatorstwo pracy, rzetelność jej wykonania, umiejętność skonfrontowania własnych wyników z danymi literaturowymi oraz potencjalne aspekty praktyczne i kliniczne tej pracy. Bardzo nieliczne niedociągnięcia, głównie korektorskie nie umniejszają jakości pracy.

Z merytorycznego punktu widzenia wyrażam opinię, że oceniana rozprawa stanowi istotny przyczynek do naszej wiedzy o diagnostyce, ocenie leczenia i rokowania pacjentów z błoniastym kłębuszkowym zapaleniem nerek.

Rozprawa doktorska lek. Dagny Rukasz spełnia ustawowe wymogi uzyskania stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

Dlatego wnoszę do Rady Dyscyplin Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Dagny Rukasz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

7049694 Prof. dr hab. Jacek Małyszko
specjalista nefrolog, hipertensjolog,
transplantolog kliniczny,
choroby wewnętrzne