



WARSZAWSKI  
UNIwersYTET  
MEDYCZNY

ZAKŁAD PIELĘGNIARSTWA NEFROLOGICZNEGO

Warszawa, 04-09-2023 r.

Wojskowy Instytut Medyczny  
Państwowy Instytut Badawczy  
Ul. Szaserów 128  
04-141 Warszawa 44

**Ocena rozprawy doktorskiej lekarz medycyny Karoliny Konieczniak pt.  
“ Znaczenie wybranych cząsteczek microRNA w diagnostyce nefropatii IgA”.**

Biopsja nerki jest złotym standardem w diagnostyce glomerulopatii. Stanowi bardzo istotne narzędzie diagnostyczne w nefrologii. Istnieje jednak wiele przeciwwskazań do wykonania tego badania, przez co wielu pacjentów nie ma postawionej ostatecznej diagnozy, ale i nie mają możliwości oceny skuteczności leczenia bądź postępu choroby. Nie można też dobrać właściwego schematu leczenia. Nie należy zapominać iż biopsja jest zabiegiem obciążonym ryzykiem powiań, z czego krwaki i krwawienie z układu moczowego należą do tych najłagodniejszych. Jak podają statystyki w jednym przypadku na 10000 może dojść do zgonu. Istnieje wiele doniesień naukowych o możliwości nieinwazyjnej diagnostyki chorób nerek. Ideę tę można odnieść do próby diagnostyki rozpoznania procesu odrzucania poprzez ocenę osadu moczu. Był to temat rozprawy doktorskiej mojego autorstwa w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku.

Współcześnie jedną z takich metod jest analiza ekspresji cząsteczek microRNA. Zaletą tej innowacyjnej metody diagnostycznej jest fakt, że powyższe cząsteczki można wykryć w różnych materiałach biologicznych, takich jak krew i mocz.

MicroRNA stanowi klasę krótkich, endogennych niekodujących cząsteczek RNA o długości 20 – 25 nukleotydów. Powstają one zarówno w komórkach roślinnych, zwierzęcych, jak i ludzkich, gdzie uczestniczą w regulacji genów na poziomie potranskrypcyjnym. W wyniku tworzenia komplementarnych par zasad z docelowym informacyjnym RNA (mRNA) prowadzą do jego wyciszenia albo poprzez degradację bądź przez zahamowanie translacji i syntezy białka. Szacuje



WYDZIAŁ NAUK  
O ZDROWIU  
WUM

ul. Oczki 8  
02-007 Warszawa  
www.zpn.wum.edu.pl

tel.: +48 22 50 21 874  
janusz.wyzgal@wum.edu.pl

się, że w ludzkim genomie zakodowanych jest ponad 2500 różnych cząsteczek microRNA co może stanowić ponad 5% wszystkich genów. Kontrolują one ekspresję ponad 1/3 genów niosących informację o polipeptydach w komórkach, a jeden typ microRNA może brać udział w wyhamowaniu aktywności wielu różnych genów docelowych jednocześnie. Ze względu na swoją funkcję regulacyjną microRNA pełnią istotną rolę w przebiegu wielu ważnych procesów komórkowych, takich jak zaprogramowana śmierć komórki, regulacja cyklu komórkowego, podziały komórek i ich różnicowanie czy transformacja nowotworowa. MicroRNA charakteryzuje się swoistością narządową.

Obecnie obserwuje się wzrost zainteresowania cząsteczkami microRNA pod kątem ich wykorzystania w praktyce klinicznej, jako swoistych wskaźników pomocnych w diagnostyce niektórych chorób, ocenie rokowania czy monitorowaniu skuteczności leczenia. Jedną z tych metod jest analiza ekspresji cząsteczek microRNA. Tym problemem zajęła się lekarz medycyny Karolina Konieczniak.

Praca doktorska przedstawiona do recenzji ma układ typowy. Jest napisana bardzo jasno i starannie pod względem redakcyjnym.

Wstęp pracy napisany jest w sposób zwarty. Lekarz medycyny Karolina Konieczniak wprowadziła czytających w problematykę dotyczącą microRNA jego roli fizjologicznej i metod wykrywania. Szczególnie autorka zwróciła uwagę na wykorzystanie metody mikromacierzy do określenia ekspresji microRNA w komórkach, tkankach i w organach. Posługując się cząsteczkami microRNA jako biomarkerami chorób nerek, wydaje się, że mocz jest najlepszym materiałem do diagnostyki, ze względu na stabilność cząsteczki umieszczonej w egzosomach. Cząsteczkę można również wyizolować z krwi. Określiła również patofizjologiczną rolę specyficznych dla nerek microRNA w powstawaniu chorób tego narządu. Znaczącą część wstępu zajmuje nefropatia IgA, jej epidemiologia, patogenezą, klinika oraz metody leczenia. Zwróciła również szczególną uwagę na diagnostyczną rolę biopsji w rozpoznaniu choroby oraz prognostycznej roli dostępnych klasyfikacji.

Wstęp napisany jest bardzo dobrze, a po jego przeczytaniu nie mam wątpliwości, że Doktorantka posiada szeroką wiedzę z zakresu omawianego tematu.

Uzasadniając wybór tematu lekarz medycyny Karolina Konieczniak zaplanowała:

Cel główny:

Ocena znaczenia wybranych microRNA w diagnostyce nefropatii IgA oraz w monitorowaniu skuteczności leczenia.

Cele szczegółowe:

1. Ocena ekspresji cząsteczek microRNA miR-146a, miR-155, miR-200b, miR-429 w osadzie moczu i we krwi.



2. Ocena zależności między ekspresją cząsteczek miRNA we krwi w moczu, a stężeniem IL-1beta, IL6, IL8, RANTES w surowicy krwi i w moczu.
3. Ocena zależności ekspresji mikroRNA od stopnia zaawansowania choroby oraz obrazu histopatologicznego w klasyfikacji Oxfordzkiej i Haasa.

Cele pracy są sformułowane jasno i bardzo ambitnie.

Opis części metodycznej i protokołu badania jest szczegółowy.

Protokół badania uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie.

Projekt został sfinansowany w ramach działalności statutowej – projekt promotorski, przez Wojskowy Instytut Medyczny.

Zastosowane metody laboratoryjne nie budzą zastrzeżeń. Nowatorskie i innowacyjne jest oznaczenie ekspresji cząsteczek miRNA 146, miRNA155, miRNA200b, miRNA429 oraz stężenie IL-1beta, IL-6, IL-8 oraz RANTES.

Do badania zakwalifikowano 53 osoby podzielone na 2 grupy:

Grupa badana – 27 osób - 14 kobiet i 13 mężczyzn.

Kryteriami kwalifikacji do badania były:

- Świadoma, dobrowolna, pisemna zgoda,
- Wiek  $\geq 18$  lat,
- Pacjenci obu płci z rozpoznaną nefropatią IgA zakwalifikowani do leczenia immunosupresyjnego.

Grupa kontrolna – 26 osób - 14 kobiet i 12 mężczyzn, bez chorób przewlekłych w wywiadach, w tym bez chorób nerek oraz podejrzenia takiej choroby.

Próbki krwi i moczu do badań laboratoryjnych pobierane były po włączeniu chorego do badania, czyli przed rozpoczęciem leczenia immunosupresyjnego nefropatii IgA oraz po 6 miesiącach od rozpoczęcia leczenia. Obejmowały one:

- Stężenie kreatyniny w surowicy,
- EGFR – wyliczany przy użyciu uproszczonego wzoru MDRD,
- Mocznik w surowicy,
- Białko całkowite w surowicy,
- Albumina w surowicy,
- Białkomocz dobowy,
- Badanie ogólne moczu
- miRNA146, miRNA155, miRNA200b, miRNA429
- Stężenie IL-1beta, IL-6, IL-8, RANTES.

Wyniki zostały starannie opracowane i szczegółowo ilustrowane w 32 tabelach i 23 wykresach.

Autorka udowodniła istotnie statystyczną różnicę pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną dla miR - 146a, miR – 155 oraz miR 429. Ekspresja wyżej

wymienionych cząsteczek była wyższa w grupie badanej niż kontrolnej zarówno we krwi i w moczu. Nie stwierdzono natomiast podwyższonej ekspresji miR – 200b.

W badaniu kontrolnym wykonanym 6 miesięcy od rozpoczęcia leczenia stwierdzono istotną statystycznie różnicę w ekspresji miR – 146a, miR – 155 oraz miR – 429 pomiędzy grupą badaną, a kontrolną we krwi. To samo zaobserwowano w ekspresji wszystkich badanych cząsteczek miRNA w moczu. We krwi stwierdzono niższą ekspresję miR – 146a w grupie badanej niż grupie kontrolnej. Ekspresja cząsteczek miR – 155 i miR – 429 we krwi w grupie badanej była istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej. W moczu stwierdzono istotnie niższe wartości miR -155, miR – 200b oraz miR – 429 w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą badaną.

Analizując różnicę stężenia cytokin między grupą chorych z nefropatią IgA, a grupa kontrolną, otrzymano istotnie statystycznie wyższe stężenie IL-1beta, IL-6, IL-8 oraz RANTES w grupie badanej niż w grupie kontrolnej.

Z kolei analizując zmianę stężenia wybranych cytokin we krwi w moczu, w grupie badanej, w oznaczeniu wykonanym wyjściowo i po 6 miesiącach, zaobserwowano istotnie statystycznie obniżenie stężenia IL – 2beta, IL – 6, i IL – 8 oraz RANTES. Co świadczy o zmniejszeniu procesu zapalnego w przebiegu nefropatii IgA.

W grupie pacjentów ze zmianami morfologicznym w klasie IV według Hassa, stwierdzono statystycznie niższe stężenie IL – 8 w moczu w oznaczeniu wyjściowym niż grupa pacjentów ze zmianami morfologicznymi w klasie III.

Ciekawa jest również obserwacja Autorki dotycząca mutacji homozygot poszczególnych miRNA na zwiększone ryzyko zachorowania na nefropatię IgA.

Wyniki badań są interesujące i oryginalne.

Rozdział “Dyskusja” jest bardzo wartościowym elementem rozprawy doktorskiej. Lekarka medycyny Karolina Konieczniak w sposób przekonujący prezentuje w nim wyniki swoich badań porównując je z doniesieniami innych badaczy. Doktorantka przedyskutowała swoje dane w oparciu o prawidłowo dobrane i aktualne piśmiennictwo liczące 134 pozycji.

Rozprawę doktorską kończy 5 wniosków, które realizują w pełni założone cele pracy. Uważam, że praca doktorska lekarza medycyny Karoliny Konieczniak jest nowatorska i innowacyjna. Pogłębia naszą wiedzę na temat diagnostyki nieinwazyjnej nefropatii IgA i oceny skuteczności leczenia. Może być podstawą do rozważenia stosowania oceny ekspresji cząstek miRNA do potwierdzenia nefropatii IgA bez wykonania biopsji.

Praca stanowi samodzielny dorobek Kandydatki i świadczy o znajomości tematu oraz umiejętności prowadzenia badań naukowych.



Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 1010 z późn. zm.).

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Wojskowego Instytutu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarza medycyny Karoliny Konieczniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zwarzywszy na nowatorski i innowacyjny charakter dysertacji, jej wysoką wartość naukową, czyniącą przełom w nieinwazyjnej diagnostyce nefrologicznej wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr. hab. n. med. Janusz Wyzgał

Zakład Pięlegniarstwa Nefrologicznego  
KIEROWNIK  
Prof. dr. hab. n. med. Janusz Wyzgał



WYDZIAŁ NAUK  
O ZDROWIU  
WUM

ul. Człki 8  
02-007 Warszawa  
www.zpn.wum.edu.pl

tel: +48 22 50 21 874  
janusz.wyzgal@wum.edu.pl