

Łódź, 05.09.2023

**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*

## **RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ**

lekarz Karoliny Konieczniak

*„Znaczenie wybranych cząsteczek microRNA w diagnostyce nefropatii IgA”*

Badania wykonano w Klinice Chorób Wewnętrznych, Nefrologii i Dializoterapii  
Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie

**Promotor:** Prof dr hab. n. med. Stanisław Niemczyk

**Promotor pomocniczy:** dr hab. n. med. Aleksandra Rymarz

Nefropatia IgA jest najczęstszym kłębuszkowym zapaleniem nerek (KZN) rozpoznawanym u osób dorosłych, nie chorujących na cukrzycę. Jest to choroba o podłożu zapalnym, w jej etiopatogenezie uczestniczy wiele czynników. Pomimo dość łagodnych objawów klinicznych, zwykle choroba objawia się krwinkomoczem z subnerczycowym białkomoczem, dużo rzadziej zespołem nerczycowym, to jednak schyłkowa niewydolność nerek opisywana jest u 15% do 20% pacjentów po 10 latach, a u 30% do 40% po 20 latach od rozpoznania. Rozpoznając nefropatię IgA nefrolog musi podjąć decyzję, czy chory wymaga jedynie włączenia nefroprotekcijnego czy też leczenia immunosupresyjnego. Znane są czynniki złego rokowania, schematy postępowania, jednak jak w większości nefropatii obowiązuje duża indywidualizacja terapii. Są bowiem pacjenci którzy wymykają się standardom postępowania i przebieg choroby jest inny niż wskazywałyby na to dane kliniczne, zmiany histopatologiczne, czynniki ryzyka czy rekomendacje. Stąd poszukiwanie nowych wskaźników diagnostyczno-terapeutyczno-rokowniczych dla tej jednostki chorobowej ma ogromne znaczenie kliniczne. Z tym tematem – biomarkerów oznaczanych we krwi i moczu u pacjentów z rozpoznaną nefropatią IgA, postanowiła zmierzyć się Doktorantka w swojej pracy naukowej będącej tematem przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. W swej pracy będzie badała nowoczesne biomarkery – ekspresję mikroRNA. Liczne badania wskazują na ogromne znaczenie microRNA w różnych procesach biologicznych. Obniżenie lub podwyższenie ekspresji różnych typów miRNA wykazano w różnych strukturach nerki, w tym w podocytach czy komórkach nabłonka kanalików nerkowych. Zaburzenia te u myszy wiążą się z występowaniem masywnego zespołu nerczycowego i włóknieniem śródmiąższu oraz stwardnieniem kłębuszków nerkowych. Stąd podjęta przez Koleżankę ocena znaczenia wybranych cząsteczek microRNA w diagnostyce nefropatii IgA jest uzasadniona.

Przedstawiona do oceny praca liczy 111 strony, zawierające 32 tabele, 23 wykresy i 4 ryciny i ma układ typowy dla prac na stopień naukowy doktora. Godna podkreślenia jest staranna edycja rozprawy. Na początku Autorka zamieściła przejrzysty i ułatwiający poruszanie się po pracy Spis treści oraz wyjaśnienie stosowanych skrótów. Wyodrębnione rozdziały to Wstęp z uzasadnieniem wyboru tematu pracy, Cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Omówienie, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim. Wykaz tabel, wykresów i rycin. Na końcu pracy umieszczono spis bardzo trafnie dobranych i aktualnych 134 pozycji piśmiennictwa.

Autorka we wstępie zamieszcza podstawowe informacje o microRNA, a następnie przedstawia znaczenie tych cząsteczek w patogenezie różnych chorób nerek, w tym KZN. Kolejny rozdział wstępu poświęcony jest już samej nefropatii IgA. Doktorantka przedstawia patogenezę nefropatii IgA z uwzględnieniem jej czterech kluczowych elementów: krążących kompleksów immunologicznych ubogich w galaktozę immunoglobuliny A, produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko ubogiej w galaktozę IgA1, tworzeniu nieprawidłowych kompleksów immunologicznych oraz ich odkładaniu w mezangium i inicjacji procesów zapalnych. Zwraca uwagę czytelne przedstawienie patogenezы na zamieszczonych rycinach. Następnie opisuje przebieg kliniczny choroby oraz kolejne kroki diagnostyczne z opisem dokładnym techniki wykonywania biopsji jako złotego standardu diagnostycznego tej nefropatii. Opisuje również Autorka zmiany histopatologiczne na podstawie których rozpoznaje się IgAN oraz kryteria dwóch powszechnie stosowanych klasyfikacji: Oksfordzkiej MEST-C oraz wg Haasa, które będzie później wykorzystywała w warsztacie swojego badania. W kolejnym podrozdziale Doktorantka przedstawia zasady leczenia i kwalifikacji chorych do poszczególnych schematów leczenia. Wspomina o nowych lekach: inhibitorach SGLT-2 w hamowaniu progresji nefropatii IgA. Trzeba podkreślić, że w międzyczasie została ta grupa leków ujęta już w zaleceniach nefroprotekcji w KZN, w tym w nefropatii IgA. W rozdziale poświęconym terapii warto byłoby wspomnieć również o sparsentanie dającym podwójną blokadę: endoteliny i receptora angiotensyny drugiej, jako obiecującym leku w nefropatii IgA. Pisze Doktorantka w wstępie o skuteczności dużych dawek systemowo podawanych GKS w leczeniu IgAN, bardzo słusznie bo przecież to choroba o podłożu zapalnym. Warto byłoby dodać, że wykazano skuteczność zredukowanych dawek metylprednizolonu w leczeniu IgAN (JAMA, 2022; 327:1888-18980. Warto również wspomnieć o miejscowo działającym w jelitach budezonidzie (badanie NEFIGAN; KI 2023;103:391-402). Rzeczywiście zalecenia KDIGO, jak słusznie zauważa Doktorantka, nie rekomendują MMF w leczeniu IgAN. Jednak w ostatnim czasie ukazały się prace (Am J Kidney Dis 2017;69:788-795 i Clinical Kidney Journal 2022, 15: 771-777) przemawiające za skutecznością połączenia GKS i MMF w hamowaniu progresji choroby. Zatem IgAN pozostaje nadal bardzo ciekawą nefropatią i wyzwaniem dla badaczy zarówno w kwestii poszukiwania nowych markerów diagnostycznych oraz prognostycznych – zwłaszcza u pacjentów, którzy nie mogą być poddani biopsji nerki.

W ostatnim podrozdziale Wstępu Doktorantka uzasadnia w sposób przekonujący dlaczego podjęła taki temat w swoich dociekaniach naukowych. Wstęp stanowi dobre podłoże do

wyjaśnienia założeń i celów pracy oraz wyboru do swoich badań ekspresji cząsteczek mikroRNA jako biomarkerów nefropatii IgA.

Uwagi do tej części pracy:

- *Sugerowałabym podkreślenie w tym rozdziale, znaczenia morfologii erytrocytów i różnicowania obecności erytrocytów wylugowanych/waleczków erytrocytarnych versus świeży krwinkomocz, w diagnostyce kłębuszkowych chorób nerek.*
- *Biorąc pod uwagę wykonane przez Doktorantkę badania uzupełniłabym wstęp o zagadnienia dotyczące cytokin prozapalnych w rozwoju IgAN. Bowiem oznaczenia cytokin stanowią część pracy badawczej.*
- *Doktorantka będzie również oznaczała allele dla badanych microRNA – jest to dość istotna część pracy, więc warto byłoby już we wstępie wspomnieć o dostępnym na ten temat piśmiennictwie, oraz bardziej wyeksponować te oznaczenia w metodyce.*
- *Z obowiązku recenzenta, muszę zaznaczyć, że w kilku miejscach brak jest wyjaśnienia w tekście pierwszorazowo zastosowanego skrótu (dotyczy to powszechnie znanych skrótów np. ESKD, ale powinno się takowe w tekście znaleźć).*

Cele pracy zostały określone w postaci jednego celu głównego i 3. szczegółowych. Sformułowane są jasno i przejrzysto, a krótki poprzedzający je podrozdział zawierający uzasadnienie wyboru tematu badań oraz informacje zawarte we wstępie zachęcają klinicystę do prześledzenia wyników, gdyż zmierzają się nie tylko z oceną znaczenia diagnostycznego ekspresji wybranych cząsteczek microRNA, ale również monitorowania skuteczności leczenia i w związku z tym wartości prognostycznej tych nowoczesnych markerów. Doktorantka postanowiła ponadto zbadać korelacje między badaną ekspresją markerów, a przebiegiem klinicznym i parametrami histopatologicznymi IgAN.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera informacje na temat metod badawczych użytych w pracy. Realizacji postawionych celów posłużyło prospektywne, obserwacyjne badanie przeprowadzone wśród 53 chorych pozostający pod opieką Kliniki Chorób Wewnętrznych, Nefrologii i Dializoterapii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie. Grupę badaną stanowiło początkowo 27 chorych zakwalifikowanych do leczenia immunosupresyjnego z powodu stwierdzonej na podstawie biopsji nerki IgAN. Badanie miało charakter prospektywny – analizowano dane sprzed włączenia leczenia oraz po 6 miesiącach od jego włączenia –

ostatecznie analizie poddano wyniki 17 chorych. 26 osób bez choroby nerek dobranych pod względem płci i wieku stanowiło grupę kontrolną.

W rozdziale Materiał i metody brakuje mi informacji *jakim schematom leczenia immunosupresyjnego zostali poddani chorzy. Dość znaczna część chorych (40%) miała w badaniu hist-pat stwierdzone półksiężycy komórkowe. Czy chorzy Ci otrzymali tylko steroidy, czy też inne leki immunosupresyjne?*

*Ponadto jak już wspomniano w metodyce słabo jest wyeksponowane, że w badaniu oznaczano również allele microRNA i badano polifformizmy pojedynczych genów (SNP).*

Rozdział „Wyniki” opracowany jest bardzo rzetelnie, zawiera opracowania statystyczne wielu danych. Bardzo wartościowe jest odniesienie danych zebranych od pacjentów z IgAN zarówno przed jak i po leczeniu i ich odniesienie również w dwóch punktach czasowych do bardzo dobrze dobranych względem płci i wieku zdrowych osób. Oprócz wyników ekspresji badanych microRNA, stężeń cytokin badanych przed włączeniem leczenia immunosupresyjnego oraz po 6. miesiącach jego prowadzenia, Doktorantka bardzo wnikliwie przedstawiła wyniki badań histopatologicznych. Trzeba podkreślić, że zostały wykonane na podstawie reprezentatywnych biopsji, gdyż średnio biopaty zawierały około 15 kłębuszków. Doktorantka bardzo szczegółowo przedstawia zmiany histopatologiczne stwierdzone u badanych chorych, opisane z użyciem *klasyfikacji Oxfordzkiej* oraz *wg Haasa*, w postaci tabel i rycin. Na podstawie opisanych wyników wydaje się, że wybór badanych miR-146a, miR-155 oraz miR-429, był trafny, bowiem stwierdzono wyższą ich ekspresję we krwi i moczu u pacjentów z IgAN przed podjęciem leczenia niż u osób zdrowych. Nie wykazano takiej zależności dla miR-200b. Podobnie stężenie badanych cytokin IL-1beta, IL-6, IL-8 oraz RANTES okazało się istotnie wyższe u pacjentów z IgAN niż u osób bez choroby nerek. Natomiast wszystkie oceniane wskaźniki we krwi uległy zmniejszeniu po leczeniu immunosupresyjnym. W moczu odnotowano zwiększenie miR-200b. Bardzo trudna dla czytelnika jest analiza i wyciągnięcie właściwych wniosków z przeprowadzonych badań genetycznych i ocena polifformizmu pojedynczych genów (SNP). Choć trzeba przyznać że Autorka stara się przedstawić wyniki swoich badań w jak najbardziej przejrzysty sposób prezentując je w formie tabel i wykresów.

W dyskusji Doktoranta przedstawia swoje wyniki i obserwacje na tle dobrze dobranych i aktualnych doniesień, prawidłowo cytując literaturę, choć w niektórych aspektach jej badania

są pionierskie i nie może się odnieść wobec tego do danych literaturowych. Sugerowałabym podzielenie dyskusji na podrozdziały, co skutkowałoby łatwiejszą interpretacją uzyskanych wyników tak licznych przeprowadzonych analiz. Ponadto część informacji podstawowych zwłaszcza dotyczących cytokim można byłoby przenieść do wstępu, a w dyskusji jedynie zaprezentować swoje wyniki na tle innych publikacji. Analizując uzyskane wyniki badań Doktorantki jak i ich przedstawienie na kanwie doniesień innych badaczy wydaje się, że słuszne jest włączenie leczenia immunosupresyjnego w IgAN, gdyż wyraźnie widać zmniejszenie ekspresji wykładników zapalenia po 6-miesięcznym leczeniu. Bardzo istotna też wydaje się obserwacja poczyniona przez Doktorantkę, a wynikająca z analizy badań polimorfizmów genów pacjentów z grupy badanej i kontrolnej, jak i przytoczone dane z literatury, sugerujące istotny wpływ homozygot zmutowanych dla poszczególnych miRNA na zwiększone ryzyko zachorowania na IgAN. Być może jest to przyszłościowy kierunek badań.

Wszystkie najistotniejsze obserwacje z przeprowadzonych analiz Autorka umieszcza w postaci 5 istotnych klinicznie wniosków końcowych, przy czym 4 z nich są konsekwentną i jasną odpowiedzią na założone cele. Natomiast piąty wniosek nie został ujęty w celach pracy, choć ma dużą wartość poznawczą.


Przedstawiona mi do recenzji praca ma dużą wartość naukową, uważam, że warto byłoby kontynuować badania i objąć dalszą obserwacją kliniczną uczestników badania. Odnieść ekspresję badanych cząsteczek, i zweryfikować czy odgrywają one rolę prognostyczną w dłuższym czasie obserwacji 2-, 5-letnim albo i jeszcze odleglejszym. Warto byłoby ocenić ekspresję tych cząsteczek u pacjentów z IgAN poddawanych tylko leczeniu nefroprotekcijnemu, bez stosowania immunosupresji, jak również w innych nefropatiach np. FSGS. Te zagadnienia mogą być tematem przyszłych dociekań naukowych Doktorantki, która umiejętnie posługuje się warsztatem badawczym i wykazuje dużą wiedzę w zakresie badanych zagadnień.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Karoliny Konieczniak 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 Naukowej Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie wniosek o dopuszczenie lek. Karoliny Konieczniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n med. Ilona Kurnatowska



Prof. dr hab. n. med. Ilona Kurnatowska  
specjalista chorób wewnętrznych  
nefrologii i transplantologii klinicznej  
6713855