

Warszawa. 14.01.2014 r.

Recenzja pracy doktorskiej lek. Anny Jakubowskiej pt. *Ocena przydatności oznaczania aneksyny V u dzieci z idiopatycznym zespołem nerczycowym leczonych steroidami i cyklosporyną A*

Cyklosporyna A (CsA) jest lekiem o długiej historii oraz licznych wskazaniach do stosowania w praktyce klinicznej. Przy wielu zaletach, jest także lekiem o tzw. wąskim oknie terapeutycznym, co oznacza, że zakres optymalnego stężenia (między poziomem nieskutecznym, a toksycznym) jest niewielki. Stosowana m.in. w leczeniu chorób kłębuszków nerkowych przebiegających z białkomoczem oraz celem zapobiegania odrzucaniu przeszczepu nerki – paradoksalnie jest lekiem nefrotoksycznym. Dzieje się tak pomimo że > 90% puli leku podanego drogą doustną wydalą się z żółcią, a jedynie ok. 6% z moczem. Nefrotoksyczność tego leku jest wieloczynnikowa, może mieć charakter ostry i przewlekły, powodować przemijającą lub trwałą dysfunkcję nerek oraz w pewnych przypadkach nieodwracalne zmiany strukturalne. Zakres lokalnego działania cyklosporyny to wpływ na mięśniówkę i śródbłonek drobnych naczyń wewnątrznerkowych, wtórne do lokalnego niedokrwienia włóknienie, bezpośredni wpływ na cewki bliższe, pętlę Henlego i cewkę dalszą oraz bezpośredni profibrotyczny wpływ na tkankę śródmiąższową. Wywoływanie tych skutków angażuje wiele różnych mechanizmów, cząsteczek, hormonów i układów enzymatycznych. Część tych efektów zależy bezpośrednio od (wysokiego) stężenia leku we krwi, a inne są od niego niezależne. Dotyczy to m.in. bezpośredniego efektu gwałtownej śmierci komórkowej przy stężeniu toksycznym oraz apoptozy komórek przy niskim stężeniu leku. Z praktycznego punktu widzenia, w przypadkach zespołu nerczycowego – istotnym zagadnieniem jest wykrycie w porę przewlekłej nefrotoksyczności leku i podjęcie decyzji o kontynuacji leczenia (mimo to) lub przerwaniu go, przy całej świadomości, że skończy się

to kolejnym nawrotem choroby, zależnej od innych także toksycznych leków. Decyzja taka nie jest łatwa.

Poszukiwanie swoistych biomarkerów wczesnej nefrotoksyczności cyklosporyny jest stale aktualnym zagadnieniem, stąd **wybór tematu** tej pracy doktorskiej jest **celowy i uzasadniony** merytorycznie.

W recenzowanej pracy podjęto ocenę przydatności badania stężenia w osoczu i w moczu dzieci z zespołem nerczycowym aneksyny V, uromoduliny i cząsteczki KIM-1 oraz określenie przydatności tych oznaczeń dla monitorowania nefrotoksyczności CsA. Aneksyna V występuje m.in. w komórkach kanalików dystalnych oraz nabłonka kłębuszków nerkowych i jest związana z apoptozą tych komórek. KIM-1 w sytuacjach patologicznych pojawia się na powierzchni komórek nabłonka cewek bliższych i wydalanie tej cząsteczki z moczem jest uznawane za marker uszkodzenia cewek proksymalnych. Uromodulina (dawniej zwana białkiem Tamma-Horsfalla) jest glikoproteiną produkowaną przez komórki nabłonka cewek dalszych i ramienia wstępującego pętli Henlego. Jego rola jest wieloznaczna, niemniej uznaje się (m. in.), że zwiększona obecność tego białka w moczu może być dowodem na działanie mechanizmu obronnego przy obecności szkodliwego bodźca (samo stwierdzenie jej wyższego stężenia w moczu nie dowodzi, że uromodulina jest szkodliwa *per se*).

Ocena jakości pracy doktorskiej

W pracy badano stężenie wyżej opisanych substancji w osoczu i moczu u 30 dzieci z zespołem nerczycowym, przed i po włączeniu cyklosporyny A – przez 12 miesięcy jej stosowania. Grupę kontrolną stanowiło 20 dzieci z pierwotnym monosymptomatycznym moczeniem nocnym. Wszyscy pacjenci mieli w pełni wydolne nerki, zarówno na początku, jak i na końcu obserwacji. Nie odnotowano tubulopatii. CsA stosowano w ogólnie zalecanej dawce rzędu 3-5 mg/kg m.c./dobę, a stężenie CsA we krwi utrzymywano w zakresie 60 do 149 ng/ml.

Metodyka pracy związana z oceną stężenia wybranych biomarkerów jest nowoczesna i na wysokim poziomie merytorycznym. Warsztat analizy statystycznej jest dobrze dobrany do potrzeb zadania badawczego.

Wyniki (ogólnie): - sugerują możliwość występowania niemego klinicznie uszkodzenia cewek bliższych i dalszych, już w czasie pierwszych 6 miesięcy leczenia niską dawką cyklosporyny, przy nieobecności dużego białkomoczu

- jako, że nie wykazano korelacji między wielkością wydalania z moczem badanych biomarkerów, a stężeniem CsA we krwi, sugeruje to bezpośrednio, niezależne od stężenia działanie leku na nefron, co (w oparciu o inne publikowane dane) sugeruje zjawisko *apoptozy niezależnej od stężenia CsA*.

- przy różnicy w zakresie dynamiki zmian stężenia biomarkerów (w moczu) w czasie, wydaje się, że po 12 miesięcy leczenia efekt „toksyczny” CsA był bardziej wyraźny w odniesieniu do cewki dalszej (w porównaniu z cewką bliższą); nadal przy nieobecności klasycznych objawów nefrotoksyczności

- wyniki wskazują na brak uzasadnienia do oznaczania stężenia tych biomarkerów w osoczu oraz brak swoistości podwyższonego stężenia biomarkerów w moczu w odniesieniu do typu choroby (stratyfikowanego ze względu na reakcję na steroidy); wykazano także, że ich stężenie było istotnie podwyższone już przed rozpoczęciem leczenia CsA, co sugeruje także ich niepełną swoistość w odniesieniu do działania cyklosporyny na cewki nerkowe. Nie jest jasne, dlaczego u tych chorych (przed leczeniem CsA) nie wykazano korelacji między stężeniem biomarkerów i wielkością białkomoczu. W innych publikowanych pracach (u chorych nieleczonych CsA) wykazano taką korelację w odniesieniu do NGAL, sugerując, że „nefrotoksyczność” (manifestująca się zwiększonym wydalaniem NGAL/kreat. z moczem) jest skutkiem toksycznego lokalnego działania białka, wchłanianego zwrotnie, w nadmiarze, przez nabłonek cewek bliższych przy masywnym białkomoczu.

Wyniki tej pracy mają bardziej charakter **poznawczy**, niż praktyczny, bowiem nie można stwierdzić, aby przy informacji o wzmożonym

wydalaniu badanych biomarkerów – i przy braku jakichkolwiek klinicznych lub (klasycznych) laboratoryjnych objawów nefrotoksyczności leku, należało leczenie cyklosporyną przerwać lub z zasady skrócić do 12 miesięcy. Być może należy bardziej starannie, prospektywnie i częściej monitorować czynność nerek (w tym cewek nerkowych) u tych chorych, u których stężenie tych biomarkerów w moczu jest najwyższe. Czy wyniki pracy znajdą praktyczne zastosowanie – czas pokaże, w tym zwłaszcza przedłużona długość obserwacji na leczeniu cyklosporyną i odnalezienie odpowiednich korelacji z udokumentowaną klinicznie nefrotoksycznością leku (przy nieobecności nadmiaru „toksycznego” białka w moczu).

Niemniej, opracowanie to stanowi **ważny innowacyjny wkład** w poznanie mechanizmów bezpośredniej toksyczności cyklosporyny, nadal pełnych wielu niewiadomych.

Ocena redakcyjna pracy:

Rozprawa jest napisana starannie, na 105 stronach, w klasycznym układzie. Zawiera m.in. 20 tabel i 18 rycin oraz 139 pozycji aktualnego i dobrze dobranego piśmiennictwa. Jakość redakcji uznaję za bardzo dobrą.

Uwagi krytyczne do zawartości tekstu:

- stężenie CsA na ogół oznacza się we krwi pełnej, a nie surowicy (w pracy nie podano tej metodyki, ale autorka pisze o surowicy)
- zdanie (str. 21) *Aneksyna V jest **wykorzystywana** w jednej z częściej stosowanych technik detekcji apoptozy poprzez wykrywanie zmian biochemicznych i morfologicznych zachodzących w komórkach* wymaga przeredagowania
- zdanie (str 74) *Brak związku między stężeniami aneksyny V w osoczu i moczu wskazuje, że podwyższone stężenie w moczu w IZN nie może być uważane tylko za konsekwencję zwiększonego wydalania tego białka przez błonę podstawną kłębuszków nerkowych* – wskazuje, iż autorka sądzi, że

białko to nie ulega filtracji kłębuszkowej, a jest jedynie aktywnie wydzielane do moczu przez błonę podstawną (?)

- zdanie (str. 78) *Wyniki badań własnych sugerują, że w wyniku stosowania CsA u dzieci z IZN ulegają zmianom komórki cewek dystalnych, ale dalsze leczenie nie zagraża zmniejszeniem masy czynnych nefronów* – w kontekście krótkiego (12-miesięcznego) stosowania niskiej dawki leku brzmi ryzykownie. Obecnie leczenie CsA w wielu przypadkach prowadzi się latami, więc brak różnicy w zakresie nasilenia subtelnej (niejawnej klinicznie) toksyczności w obrębie cewki dalszej w 6 i 12 (ostatnim) miesiącu obserwacji nie pozwala na takie ogólne przypuszczenia.

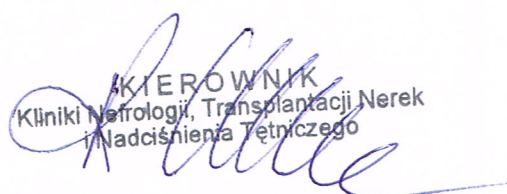
- wniosek 2 zawiera pewną nielogiczność : *Wydalenie aneksyny V z moczem może być uznane za wskaźnik uszkodzenia cewek dystalnych. Świadczy o tym wzrost wydalania AnV w z moczem korelujący z wydalaniem uromoduliny i KIM-1, uznanymi wskaźnikami zaburzeń cewek, odpowiednio: dystalnych i proksymalnych*. O uszkodzeniu cewek dystalnych ma świadczyć jednocześnie uszkodzenie cewek proksymalnych ? Jedno z drugim współistnieje i tyle. Trzeba dokonać korekty.

- wniosek 5: *Zwiększone wydalanie w moczu białek cewek nerkowych u chorych z IZN leczonych CsA, przy braku innych wskaźników nefrotoksyczności leku, potwierdza przydatność ich oznaczania dla wczesnego wykrywania zmian w nerkach* nie do końca brzmi dobrze, bowiem nie wiemy (nie wykonując ponownej biopsji po leczeniu CsA), czy jakiegokolwiek zmiany typowe dla nefrotoksyczności polekowej (w rozumieniu patomorfologicznym) w miąższu nerek tych chorych w ogóle były. Jest możliwe, że wydzielaniu do moczu pewnych ilości swoistych (opisanych w rozprawie) białek na tym etapie choroby i leczenia nie towarzyszą żadne zmiany *in-situ*.

Sugestia: *potwierdza przydatność ich oznaczania dla wczesnego wykrywania zmian w nerkach* zmienić na: *wskazuje na to, że już po 6 miesiącach stosowania leku może dochodzić do czynnościowego uszkodzenia cewek*.

Podsumowanie

Uwagi te w niczym nie umniejszają znaczenia i jakości rozprawy. Jest to praca **nowatorska**, oparta na nowoczesnym warsztacie, weryfikująca wartościową hipotezę. Doktorantka starannie i dobrze opisała podstawy teoretyczne pracy oraz potrafiła analitycznie przedstawić wyniki oraz przeprowadzić interesującą dyskusję. Rozprawa ta **spełnia kryteria** stawiane pracom doktorskim i dlatego, w oparciu o przepisy art.13 ustawy z 14 marca, 2003 r. o tytule i stopniach naukowych (Dz.U.Nr 65 poz. 595) zwracam się do Rady Wydziału Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów postępowania.


KIEROWNIK
Kliniki Neurologii, Transplantacji Nerek
i Nadciśnienia Tętniczego
Prof. zw. dr hab. n. med. Ryszard Grenda