



**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE**

**UNIWERSYTECKI SZPITAL DZIECIĘCY**  
**ul. prof. Antoniego Gębali 6, 20-093 Lublin**  
**tel.(8171-85-470,tel/fax.(81)74-30-117**  
**e-mail:ped\_nefr.@dsk.lublin.pl**  
**Klinika Nefrologii Dziecięcej II Katedry Pediatrii**

**Prof.dr hab. med.**  
**Maria Małgorzata Zajączkowska**  
**tel. 81 7185460**

**Lublin 28.02.2017**

**e-mail: [mzajaczkowska@dsk.lublin.pl](mailto:mzajaczkowska@dsk.lublin.pl)**

**Ocena rozprawy doktorskiej lek.Agnieszki Pukajło-Marczyk**  
**pt. Udział hemopeksyny, TNF alfa i IL-13 w rozwoju białkomoczu**  
**nerczycowego u dzieci**

**z Katedry i Kliniki Nefrologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego**  
**im. Pastów Śląskich we Wrocławiu**

Przedstawiona mi do recenzji praca lek. Agnieszki Pukajło-Marczyk pt. „Udział hemopeksyny, TNF alfa i IL-13 w rozwoju białkomoczu nerczycowego u dzieci”, której promotorem jest Prof. dr hab. med.Danuta Zwolińska zawiera 113 stron, 36 tabel, 4 ryciny i 120 pozycji piśmiennictwa. Rozprawa ma układ typowy. Całość poprzedza spis treści ułatwiający szybką orientację w tekście. W pracy obecny jest także wykaz skrótów, tabel i rycin, streszczenie w j.polskim i w j. angielskim.

Wstęp liczący 23 strony zawiera duży ładunek cennych informacji opartych o najnowsze piśmiennictwo, dotyczących zamierzonych badań. Doktorantka podkreśla, że idiopatyczny zespół nerczycowy (IZN), który obrała jako przedmiot badań, to najczęstsza forma zespołu nerczycowego u dzieci. Stanowi on więcej niż 90% przypadków w grupie między 1 a 10rz., a ok.50% w grupie dzieci po 10 roku życia. Jego morfologicznym podłożem w ok.80% przypadków jest zmiana minimalna, polegająca głównie na uszkodzeniu lub utracie podocytów. Obecnie

wiadomo, że podocyty, syntetyzując niektóre elementy budowy błony podstawnej oraz uwalniając enzymy proteolityczne, mają istotny wpływ na strukturę błony filtracyjnej kłębuszka nerkowego. Dlatego tym komórkom przypisuje się znaczącą rolę w patogenezie większości glomerulopatii, u podłoża których leżą defekty błony szczelinowatej związane z nieprawidłową strukturą i czynnością białek ją tworzących. Wyniki licznych badań nad patogenezą ZN wskazują niezbicie, że w rozwoju białkomoczu bierze udział układ immunologiczny, w tym dysfunkcja limfocytów T i uwalnianie przez nie cytokiny. Ponadto badacze od lat poszukują krążących w osoczu czynników zwiększających przepuszczalność błony filtracyjnej kłębuszka nerkowego. Wyniki wielu badań przemawiają za istotną rolą białek CLC-1 (cardiotrophin-like cytokine-1) oraz rozpuszczalnego receptora dla urokinazowego aktywatora plazminogenu (suPAR) a wśród innych czynników wymienia się naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). W ostatnich latach postuluje się także udział hemopeksyny (Hpx) jako czynnika krążącego wpływającego na przepuszczalność błony podstawnej kłębuszka nerkowego i przyczyniającego się do rozwoju białkomoczu. Badania sugerują wpływ Hpx na strukturę podocyta, głównie ubytek sialoglikoprotein i glikokaliksu, co prowadzić może do wzrostu przepuszczalności błony filtracyjnej dla albumin. Także cytokiny w tym IL-13 i czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF alfa) mogą mieć znaczenie w patogenezie ZN, jednakże ich rola także nie jest ostatecznie udowodniona. Dlatego badania podjęte przez lek. Agnieszkę Pukajło-Marczyk, których celem było przebadanie czy Hpx, IL-13 i TNF alfa mają swój udział we wzroście przepuszczalności bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego u dzieci z IZN, są w pełni uzasadnione. Należy podkreślić, że Autorka we wstępie szczegółowo zapoznała czytającego z biologicznym działaniem tych trzech cytokin, opisując go zwięźle i w sposób jasny oraz dokumentując dane licznymi pozycjami piśmiennictwa.

W realizacji postawionego celu Doktorantka postanowiła przeanalizować stężenia IL-13, Hpx i TNF-alfa w surowicy krwi i w moczu w ostrej fazie IZN i w remisji, w tym z uwzględnieniem I-go lub kolejnych rzutów choroby, sposobu leczenia oraz wyniku badań histopatologicznych, zarówno w IZN jak i wtórnym ZN (WZN). Badaniem objęto 51 dzieci z IZN i 10 dzieci z WZN. Pacjentów podzielono na podgrupy uwzględniając założenia jak wyżej. Grupę kontrolną stanowiło 18 dzieci z pierwotnym moczeniem nocnym. Wiek i płeć dzieci w badanych grupach i w grupie kontrolnej były adekwatne. U wszystkich dzieci poza badaniami standardowymi wykonywanymi w ZN określano stężenie Hpx, IL-13 i TNF-alfa w surowicy krwi i w moczu. Parametry te oznaczano przy użyciu metody

immunoenzymatycznej ELISA. Doktorantka opisała zasadę metody oraz podała jej czułość dla poszczególnych wskaźników badanych we krwi i w moczu. Uzyskane wyniki poddała analizie statystycznej przy pomocy testu dla danych nieparametrycznych Kruskala-Wallisa i Wilcoxon'a a dla wybranych par test korelacji Pearsona, wykorzystując komputerowy pakiet programów statystycznych EPIINFO ver.7.1.1.14.

Wyniki badań przedstawione zostały w postaci tabel oraz interpretacji umieszczonych w nich danych. Tabele 2,3 i 4 zawierają charakterystykę badanych grup pacjentów. Wynika z nich, że pacjenci z WZN byli znacząco starsi w stosunku do grupy kontrolnej i grupy z IZN. Stwierdzono niższe wartości eGFR w obu badanych grupach w porównaniu z kontrolą, a u pacjentów wymagających leczenia immunosupresyjnego znacznie większy białkomocz niż w grupie leczonych wyłącznie steroidami.

W kolejnych tabelach umieszczono wyniki badań nad stężeniem Hpx, TNF-alfa i IL-13 w surowicy krwi i w moczu w poszczególnych podgrupach. Doktorantka stwierdziła istotnie wyższe stężenie badanych parametrów w surowicy krwi i w moczu zarówno w rzucie jak i w remisji IZN w porównaniu z kontrolą, przy czym w grupie z ostrym rzutem były one znacząco wyższe niż w remisji. Porównując stężenia badanych wskaźników w surowicy u dzieci z I rzutem choroby i w kolejnych, nie stwierdzono istotnych różnic. Jedynie wartości TNF alfa u dzieci w remisji po kilku rzutach były znamienne wyższe. W moczu natomiast stwierdzono znamienne wyższe stężenie IL-13 u dzieci z kolejnym rzutem. Dotyczyło to także Hpx w fazie remisji po kolejnym rzucie.

Dalsze tabele zawierają porównanie stężenia Hpx, TNF alfa i IL-13 w surowicy krwi i w moczu między grupą IZN i WZN w aktywnej fazie choroby i w remisji. Stwierdzono, że jedynie stężenie IL-13 w moczu i tylko w fazie ostrej choroby było znamienne wyższe w IZN. Porównując stężenia badanych parametrów w surowicy krwi i w moczu w podgrupach pacjentów leczonych wyłącznie steroidami lub także lekami immunosupresyjnymi w fazie rzutu choroby i w okresie remisji Doktorantka stwierdziła, że jedynie w moczu u dzieci z rzutem ZN leczonych steroidami stężenie Hpx było wyższe w porównaniu z pacjentami leczonymi immunosupresyjnie, zaś stężenia Hpx i IL-13 znacząco niższe w okresie remisji w tej grupie badanych.

Doktorantka dokonała także analizy korelacji badanych parametrów z wartościami biochemicznych wykładników ZN, stwierdzając jedynie ujemną korelację między stężeniem Hpx a wartością CRP w surowicy. Korelacja zaś pomiędzy ocenianymi wskaźnikami u wszystkich badanych wykazała dodatnie

wartości między stężeniem Hpx i TNF alfa w moczu w rzucie ZN i ujemne między Hpx i TNF alfa w surowicy w fazie rzutu. Dodatkowo korelowały również stężenia Hpx i IL-13 w fazie rzutu IZN. Obserwowano to zwłaszcza w surowicy. W fazie remisji zaś stężenia Hpx w surowicy korelowały ujemnie ze stężeniem IL-13 w moczu zarówno w rzucie jak i w remisji. U pacjentów z IZN zależności ujemne zaobserwowano jedynie między Hpx i TNF alfa w ostrym rzucie choroby. Natomiast stężenia Hpx i IL-13 w surowicy korelowały dodatnio w rzucie, a w moczu ujemnie w remisji choroby, zaś stężenia Hpx w surowicy w okresie remisji ujemnie ze stężeniami IL-13 w moczu i w rzucie i w remisji. Dodatkowo zależności obserwowano także między stężeniem TNF alfa i IL-13 zarówno w surowicy jak i w moczu. Analiza stężeń badanych parametrów w zależności od rozpoznania histopatologicznego wykazała jedynie istotnie wyższe stężenie Hpx w moczu u pacjentów z MGN pozostających w remisji, w porównaniu do pacjentów z MCD.

Na podstawie badań Doktorantka wysunęła 8 wniosków, z których wynika że Hpx, TNF alfa i IL-13 mogą odgrywać istotną rolę w rozwoju białkomoczu nerczycowego. Wskazuje na to wzrost ich stężeń w surowicy i w moczu w aktywnej fazie IZN i spadek w okresie remisji, oraz wzajemne korelacje badanych parametrów, sugerujące współdziałanie tych molekuł. Ich podwyższone wartości w surowicy i w moczu stwierdzone po osiągnięciu remisji mogą wg Doktorantki świadczyć o utrzymywaniu się pobudzenia układu immunologicznego i konieczności kontynuacji leczenia. Stężenie IL-13 i Hpx w moczu zaś, może być przydatnym wskaźnikiem rokowniczym w przebiegu IZN, o czym świadczy zwiększone ich wydalanie w moczu u dzieci z kolejnymi nawrotami choroby, w tym leczonych immunosupresyjnie, w porównaniu do chorych z pierwszym epizodem, niezależnie od fazy choroby. Ponadto wydalanie z moczem TNF alfa i Hpx w okresie remisji może być przydatne do różnicowania podłoża morfologicznego choroby u dzieci z IZN. Doktorantka wysuwa też przypuszczenie, że Th-1-zależna cytokina, jaką jest IL-13, odgrywa wiodącą rolę w rozwoju białkomoczu w IZN. Wniosek ten opiera o stwierdzenie znacząco wyższego wydalania tej cytokiny w moczu w aktywnej fazie IZN w porównaniu do WZN, sugerując jednocześnie konieczność dalszych badań.

Swoje dociekania Doktorantka dyskutuje w rozdziale „Omówienie wyników badań i dyskusja”, konsekwentnie analizując wartości stężenia kolejnych cytokin w surowicy krwi i w moczu w poszczególnych podgrupach. Uzyskane dane umiejętnie konfrontuje z danymi piśmiennictwa. Dyskusja prowadzona jest profesjonalnie z dużą znajomością rzeczy i napisana, podobnie jak cała praca, bardzo przejrzysto. Zwraca uwagę ładny język i krótkie, dobrze sformułowane

zdania. Autorka zachowała ostrożny tok rozumowania i wyciągnęła poprawne wnioski, które odpowiadają postawionym celom.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest bardzo ambitna w założeniach i bardzo rzetelna w wykonaniu. Doktorantka wykazała dużą znajomość przedmiotu, umiejętność interpretacji wyników i wyciągania wniosków oraz poprawnego korzystania z piśmiennictwa. Praca została napisana w sposób dojrzały i kompetentny, posiada ładną szatę graficzną i dużą estetykę całości, zachęcając czytającego do lektury. Jedyna moja uwaga jako recenzenta dotyczy braku rozdziału „Podsumowanie wyników”, co znacznie ułatwiłoby czytającemu poruszanie się w natłoku uzyskanych danych. Nie umniejsza to w żaden sposób wartości pracy, gdyż nie jest to element wymagany, a zawarte w pracy treści posiadają nie tylko walory poznawcze ale także praktyczne. Sugerują bowiem możliwość wykorzystania niektórych uzyskanych wyników ( stężenie IL-13 i Hpx w moczu) jako wskaźników rokowniczych przebiegu IZN, a innych także ( stężenie TNF alfa i Hpx w moczu w okresie remisji) do różnicowania podłoża morfologicznego zmian u dzieci z IZN.

Po zapoznaniu się z całością pracy, na podstawie przedstawionej powyższej oceny stwierdzam, że praca lek. Agnieszki Pukajło – Marczyk spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i z przyjemnością mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę nowatorski charakter rozprawy, jej możliwe implikacje praktyczne, pracochłonne metody badawcze, ambitne założenia, dobrze przemyślany plan pracy, dociekliwość i umiejętność wyciągania wniosków a także bezbłędną całość dysertacji wnioskuję o wyróżnienie ww.

Promotorowi p. prof. Danucie Zwolińskiej gratuluję ambitnej i dobrze przygotowanej do pracy naukowej Doktorantki.

Prof. Maria Małgorzata Zajączkowska



