



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.

Maria Małgorzata Zajązkowska

Lublin 18.10.2016

tel. 81 7185460

e-mail: mzajazkowska@dsk.lublin.pl

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Agnieszki Bargendy
pt. „ Nowe markery wczesnego uszkodzenia i biozgodności u dzieci z
przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo i nerkozastępczo ”
Doktorantki w Katedrze i Klinice Nefrologii Pediatricznej UMW.

U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (PChN) obserwuje się poza cechami przewlekłego stanu zapalnego i uszkodzenia śródbłonna naczyń, także wzmożoną apoptozę. Stwierdzono, że nasilenie tych zmian zależy od stopnia zaawansowania PChN oraz zastosowanego leczenia. Apoptoza, czyli zaprogramowana samobójcza śmierć komórki jest zjawiskiem naturalnym w rozwoju i życiu organizmów, dotyczy wszystkich narządów i tkanek na każdym etapie ich rozwoju, począwszy od embriogenezy aż po starość i jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania, będąc aktywną formą pozbywania się komórek niepotrzebnych i uszkodzonych. Jest procesem niezmiernie złożonym, zależnym od rodzaju komórki i jej wrażliwości i wiąże się z odpowiedzią na oddziałujące bodźce, ich intensywności i czas trwania. Programowana śmierć komórki może być wzbudzana przez mechanizm mitochondrialny związany z uszkodzeniem komórki lub zewnątrzkomórkowym sygnałem przekazywanym przez

tw. receptory śmierci. Inicjować ją mogą nie tylko czynniki fizjologiczne, ale także patologiczne.. Zjawisko to charakteryzuje się aktywacją wielu swoistych szlaków biochemicznych, wymaga syntezy nowych białek, zależnych od cząsteczek sygnalizujących lub też wywołanych przez czynnik uszkadzający komórkę. Przekazywanie sygnału do apoptozy rozpoczyna się przyłączeniem liganda do receptora śmierci (Fas/FasL), w wyniku czego dochodzi do szybkiej rekrutacji białek przekazujących sygnał inicjujący kaskadę enzymów proteolitycznych(kaspaz) niszczących komórkę. Swój udział w tym zjawisku mają także m.in. metaloproteinazy (MMPs) i ich inhibitory (TIMPs). Odgrywają one kluczową rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy produkcją i degradacją białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Potwierdzono ich aktywność w wielu stanach patologicznych, w tym w chorobach nerek. Wykazano również hamujący wpływ inhibitorów metaloproteinaz TIMP-1 i TIMP-2 na procesy apoptozy komórek, m.in. przez hamowanie aktywności MMPs. Wśród innych czynników biorących udział w apoptozie wymienić trzeba białka szoku cieplnego((Hsp27),cytokiny (IL 4) i molekuly adhezyjne(e-Selektyna). Niektóre z nich np. białko szoku cieplnego Hsp27, mają charakter ochronny i antyapoptotyczny, poprzez blokowanie zewnętrznego Fas – zależnego i wewnętrznego szlaku śmierci komórki. Białko to jest uwalniane z uszkodzonych i zmienionych zapalnie komórek i pełni rolę sygnału ostrzegawczego dla układu odpornościowego, pobudzając produkcję cytokin prozapalnych i aktywację jądrowego czynnika NF-kB. Podobnie charakter ochronny przypisuje się niezbadanej dotychczas w PChN survivinie. Pomimo wielu przytaczanych w piśmiennictwie danych dotyczących apoptozy, wiedza na temat tego zjawiska jest niewystarczająca. Mnogość mechanizmów prowadzących do zaprogramowanej śmierci komórek oraz nie do końca jasne między nimi powiązania skłaniają badaczy do podejmowania dalszych badań.

W cyklu 4 prac pod wspólnym tytułem „**Nowe markery wczesnego uszkodzenia i biozgodności u dzieci z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo i nerko zastępczo**”, wśród których Doktorantka jest w 2. pierwszym i w 2. drugim Autorem, podjęto próbę ustalenia wzajemnych relacji między czynnikami biorącymi udział w zjawiskach apoptozy i pobudzenia śródbłonna, w zestawieniu z wykładnikami stanu zapalnego w różnych stopniach zaawansowania PChN.

W pierwszej z tych prac pt. ”Survivina jako nowy marker apoptozy u dzieci z przewlekłą chorobą nerek ” uzyskane wyniki podwyższonych stężeń surviviny, sFas, sFasL, Hsp27, E-selektyny i IL-4 przemawiają za równoczesnym uszkodzeniem komórek, pobudzeniem apoptozy i stanu zapalnego oraz uruchomieniem mechanizmów ochronnych już od najwcześniejszych stadiów niewydolności nerek u dzieci i nasilających się wraz z progresją choroby. Badania te przeprowadzono na dużej liczbie pacjentów (80) podzielonych na 3. grupy w zależności od stopnia zaawansowania PChN a grupę kontrolną stanowiło 30. dzieci z prawidłową funkcją nerek. Wyniki badań oparto o profesjonalne metody laboratoryjne w tym z użyciem komercyjnych zestawów do badań testem ELISA i prawidłowo przeprowadzoną analizę statystyczną. Praca, której Doktorantka jest drugim autorem została opublikowana w „Nefrologii i Dializoterapii Polskiej” w 2014 r.

W drugiej pracy z omawianego cyklu prezentowane są badania nad stężeniem surviviny, E-kadheryny i metaloproteinaz MMP-2 iMMP-9 oraz TGF-beta1, oznaczanych w moczu i surowicy u dzieci z PChN (n=41) i w grupie kontrolnej(n=23). Autorów interesował udział badanych markerów w zjawiskach włóknienia nerek, albowiem w piśmiennictwie istnieją

dowody sugerujące, że przemiana nabłonkowo- mezenchymalna (EMT) jest ważnym wydarzeniem w uszkodzeniu nerek. Charakterystycznymi cechami EMT jest m.in. utrata adhezji komórkowej i zmniejszona ekspresja E-kadheryny. Jednym z głównych regulatorów w tych zjawiskach jest czynnik wzrostu beta (TGF-beta1), który kontroluje proliferację i różnicowanie komórek. Autorzy stwierdzili istotnie wyższe stężenie MMP-2, MMP-9, FGF-beta1, E-kadheryny i surviviny zarówno w moczu jak i we krwi u pacjentów z PChN w porównaniu z kontrolą a także dodatnią korelację MMP-2, MMP-9, E-kadheryny i surviviny z TGF beta 1 i sFas, sFasL w moczu oraz istotną korelację pomiędzy stężeniem MMP-2, MMP-9 i E-kadheryny oznaczanymi we krwi i w moczu. Ponadto wykazano dodatnią korelację między stężeniem surviviny w moczu i Hsp27 w surowicy. Zdaniem Autorów podwyższone stężenia badanych markerów wskazują na pobudzenie apoptozy oraz remodelingu i włóknienia mięszu nerek u dzieci z PChN a oznaczanie surviviny w moczu może mieć wartość jako nowy niezależny biomarker nerkowej transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej. Ww. praca pt. „Urine survivin, E-cadherin and matrix metalloproteinases as novel biomarkers In children with chronic kidney disease”, w której Doktorantka jest drugim autorem została opublikowana w 2015 roku w liczącym się czasopiśmie „Biomarkers”.

W trzeciej z prac Doktorantka jest pierwszym autorem. Praca ta jest kontynuacją badań nad czynnikami biorącymi udział w procesie uszkodzania cewek i włóknieniu mięszu u pacjentów z PChN. Celem Badaczy była ocena frakcyjnego wydalania surviviny a także aktywatora metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (EMMPRIN) i MMP-7, oraz TGF beta1, jako potencjalnych markerów tego uszkodzenia. Badania przeprowadzono na grupie 41 dzieci z PChN i u 33 z grupy kontrolnych., stwierdzając istotnie wyższe stężenie ww zarówno we krwi jak i w moczu, przy czym wszystkie parametry wzajemnie ze sobą korelowały. Analiza skupień wykazała porównywalną wartość induktora MMP, E-kadheryny i TGF beta1 jako biomarkerów transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej. Praca ta pt „Fractional excretion of survivin, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase 7 in children with chronic kidney disease”, po pozytywnej recenzji została opublikowana w roku 2016 w „EMJ Nephrol.”.

W czwartej pracy Doktorantka badała nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF), różnicujący czynnik wzrostu-15(GDF-15) i survivinę u dzieci przewlekle dializowanych. Celem tej pracy była ocena użyteczności badanych czynników jako markerów biokompatybilności u dzieci dializowanych otrzewnowo (n=22) i hemodializowanych (n=19). Stwierdzono statystycznie istotnie wyższe stężenie GDF-15 i surviviny w porównaniu z grupą kontrolną (n=30). W grupie hemodializowanych było to stężenie statystycznie istotnie wyższe niż w grupie dializowanych otrzewnowo, zaś stężenie EGF, który pełni rolę ochronną w badanych procesach, było statystycznie znacznie niższe u dializowanych, przy czym u dializowanych otrzewnowo istotnie wyższe niż i hemodializowanych. Przeprowadzono także analizę badanych parametrów w trakcie pojedynczej sesji HD w porównaniu z ADO oraz zależność od wieku, czasu terapii i stanu odżywienia. Wysłunięto wnioski, że wzrost stężenia GDF-15 i surviviny wskazują na stymulację procesów zapalnych u dzieci dializowanych. Wg Doktorantki niższe stężenie EFG świadczy o braku efektywnej protekcji przeciwko niekompatybilności, zaś wyższe wartości GDF-15 i surviviny w HD niż w ADO przemawiać mogą za większą kompatybilnością ADO. Ostatecznie Autorzy uważają, że zróżnicowanie stężeń EGF, GDF-15 i surviviny u pacjentów HD, ADO oraz po pojedynczej sesji HD może wskazywać na przydatność tych substancji jako

biomarkerów biokompatybilności u przewlekle dializowanych dzieci. Praca ta, w której Doktorantka jest pierwszym autorem, ukazała się w „Biomarkers” w 2016 i nosi tytuł „Epidermal growth factor, growth differentiation factor -15 and survivin as novel biocompatibility markers in children on chronic dialysis “.

Wszystkie prace zostały napisane w sposób przejrzysty. Dokładnie opisano badane grupy pacjentów, metody laboratoryjne i statystyczne. Uzyskane wyniki badań przedstawiono w dobrze czytelnych tabelach i na rycinach. Dyskusje oparte zostały o najnowsze pozycje piśmiennictwa światowego dotyczącego omawianych zagadnień. Zostały pozytywnie zrecenzowane przez Recenzentów i opublikowane w specjalistycznych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu.

Nowatorskie treści prezentowanych prac stanowią niewątpliwy wkład do poszerzenia wiedzy na temat wzajemnych relacji czynników odpowiedzialnych za progresję PChN u dzieci. Uzyskane wyniki badań posiadają nie tylko ważne walory poznawcze ale także praktyczne. Sugerują bowiem możliwość oceny aktualnie toczących się procesów w miąższu chorych nerek u dzieci przy użyciu nowych badanych przez Doktorantkę biomarkerów jakimi są survivina, E-kadheryna i metaloproteinazy.

Prace stanowią zwarty tematycznie cykl, mają charakter badań klinicznych i laboratoryjnych. Dowodzą dużego wkładu i dobrej orientacji Doktorantki w badanym przedmiocie z umiejętnym wykorzystaniem najnowszych metod badawczych i najnowszego fachowego piśmiennictwa. Zwraca uwagę staranna szata graficzna i jasno sprecyzowane wnioski.

Podsumowując, przedstawiony do recenzji cykl 4 prac pod wspólnym tytułem „ Nowe markery wczesnego uszkodzenia i biozgodności u dzieci z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo i nerkozastępczo “ spełnia warunki Ustawy z dnia 14.03.2003.i Rozporządzenia MNiSW z dnia 30.10.2015 w sprawie szczegółowego trybu warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim. Dlatego wnoszę o dopuszczenie lek. Agnieszki Bargendy do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę nowatorską tematykę, duże znaczenie praktyczne przedstawionej pracy doktorskiej i ogromny osobisty wkład Doktorantki nie tylko w wykonanie części laboratoryjnej badań i opracowanie statystyczne, oraz uwzględniając doskonałą umiejętność wyciągania wniosków z uzyskanych wyników i ich interpretację w oparciu o światowe piśmiennictwo wnioskuję o wyróżnienie ww .

Z poważaniem

Prof.dr hab.n.med. Maria Małgorzata Zajączkowska

Klinika Nefrologii Dziecięcej II Katedry Pediatrii

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie