

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko.

Andrzej Konieczny

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska: „Rola dopełniacza w powstaniu i progresji śródmiąższowego włóknienia nerek.” Wydział Lekarski Kształcenia Podyplomowego Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, 2006 r.

Specjalizacja z dziedziny chorób wewnętrznych. Listopad 2011 r.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

- od lipca 2011 r. Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo – Naczyniowej. Wrocław, ul. Kamieńskiego 73a. Główny badacz w Zadaniu nr 4
- sierpień 2005 r.– lipiec 2011 r. Oddział Nefrologiczny z Pododdziałem Diabetologicznym i Transplantacyjnym. Wojewódzki Szpital Specjalistyczny. Ośrodek Badawczo – Rozwojowy. Wrocław, Kamieńskiego 73a. Młodszy asystent.
- październik 2005 r. – sierpień 2006 r. Klinika Nefrologii i Nadciśnienia Tętniczego, Schorzeń Reumatycznych i Immunologicznych, Kliniki Uniwersyteckiej Wyższej Nadreńsko – Westfalskiej Szkoły Technicznej w Aachen, Niemcy. Pracownik naukowy.

- maj 2004 r. – październik 2004 r. Klinika Nefrologii i Nadciśnienia Tętniczego, Schorzeń Reumatycznych i Immunologicznych Kliniki Uniwersyteckiej Wyższej Nadreńsko – Westfalskiej Szkoły Technicznej w Aachen, Niemcy. Pracownik naukowy

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego,

Mechanizmy progresji przewlekłej choroby nerek.

b) autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa,

Andrzej Konieczny. Mechanizmy progresji przewlekłej choroby nerek.
Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we
Wrocławiu. Wrocław 2014. ISBN 978-83-7055-439-2

- c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Przewlekła choroba nerek (PChN) charakteryzuje się występowaniem uszkodzenia nerek, trwającym co najmniej 3 miesiące, i wyraża się zaburzeniami w ich strukturze lub funkcji. Z punktu widzenia definicji choroby, uszkodzenie to może wyrażać się bądź jako nieprawidłowy obraz badania ogólnego moczu lub podwyższone stężenia parametrów oznaczanych w surowicy krwi, a także jako odstępstwa w strukturze narządów ujawnionych w badaniach obrazowych. Skrajnym przypadkiem przewlekłej choroby nerek jest schyłkowa niewydolność nerek (ESRD), gdy współczynnik filtracji kłębuszkowej (GFR) jest niższy niż 15 ml/min/1,73 m² i zachodzi potrzeba rozpoczęcia leczenia nerkozastępczego.

Zgodnie z danymi europejskimi, schyłkowa niewydolność nerek dotyka 120 osób na milion mieszkańców rocznie. W Polsce, w wyniku badania PoINef, stwierdzono występowanie PChN, we wszystkich jej stadiach, u 18,4% badanych. Obserwując statystyki, na przestrzeni lat można zauważyć, że liczba osób, u których stwierdzono którekolwiek stadium PChN, systematycznie rośnie. Z przedstawionych danych wynika, że głównymi przyczynami doprowadzającymi do uszkodzenia nerek są nefropatia cukrzycowa, nadciśnienie tętnicze oraz kłębuszkowe choroby nerek. Biorąc pod uwagę stale rosnącą liczbę osób chorujących na cukrzycę, należy w przyszłości spodziewać się coraz większej liczby chorych z niewydolnością nerek na tle cukrzycowej choroby nerek.

Pacjenci z PChN są narażeni na szereg powikłań, głównie dotyczących układu sercowo naczyniowego. W znaczący sposób wzrasta u nich ryzyko zgonu z powodu choroby niedokrwiennej serca (ChNS) oraz miażdżycy naczyń mózgowych. Kolejnym problemem, szczególnie w zaawansowanym stadium choroby, u chorych

poddawanych leczeniu nerkozastępczemu, są zgony z powodu uogólnionych infekcji, na skutek upośledzenia odporności.

Biorąc pod uwagę zagrożenia dla pacjentów wiążące się z PChN, jak i wynikające z tego obciążenia dla systemów opieki zdrowotnej, sprawą istotnej wagi jest znalezienie sposobów na, o ile nie na odwrócenie dokonanych już zmian, to chociażby na zahamowanie postępu choroby.

Już w latach 60-tych XX wieku udowodniono, że niezależnie od wyjściowej choroby nerek, stopień niewydolności narządu uzależniony jest od zmian w zakresie śródmiąższu. Upośledzenie funkcji nerki w sposób bezpośredni koreluje ze stopniem włóknienia oraz liczbą fibroblastów. Za powstawanie i dalszy postęp włóknienia odpowiedzialne są depozyty macierzy pozakomórowej, napływające komórki biorące udział w procesie zapalnym, akumulacja fibroblastów oraz ubytek naczyń okołocewkowych. Na podstawie badań eksperymentalnych udowodniono, iż zmiany w śródmiąższu w sposób pośredni dotyczą także kłębuszków. Dochodzi do zaburzeń w zaopatrzeniu kłębuszka w tlen i substancje odżywcze, wywołane uszkodzeniem naczyń. Uszkodzenia w śródmiąższu lepiej korelują ze stopniem niewydolności narządu, niż nasilenie zmian w kłębuszkach. Defekt w zakresie śródmiąższu jest wspólną końcową drogą wszystkich chorób nerek, niezależnie od ich pierwotnego charakteru.

W poszukiwaniu patomechanizmów odpowiedzialnych za postęp przewlekłej niewydolności nerek, skupiono się na procesach zachodzących w obrębie śródmiąższu. Lepsze zrozumienie mechanizmów biorących udział w procesie włóknienia, stwarza okazję znalezienia punktów uchwytu dla nowych metod terapeutycznych, mających na celu zahamowanie lub odwrócenie zmian prowadzących do niewydolności nerek.

Jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za zwłóknienie śródmiąższowe, jest gromadzenie się elementów macierzy pozakomórkowej, a w szczególności włókien kolagenowych. W obszarach dotkniętych zwłóknieniem przeważają kolagen typu I i III oraz fibronektyna, a także fragmenty kolagenu typu IV. W czasie przebudowy prawidłowej tkanki nerkowej, dochodzi do łączenia się włókien kolagenowych, w czym udział biorą także fibronektyna, kolagen typu V oraz integryny. Proces zwłóknienia rozpoczyna się w rejonach, gdzie dochodzi do pojawienia się procesu zapalnego. Gromadzące się wokół miejsca odczynu zapalnego fibroblasty rozpoczynają produkcję elementów macierzy pozakomórkowej, nasilając w ten sposób zwłóknienie.

Badania prowadzone nad patomechanizmami powstawania zwłóknienia śródmiąższowego, dzięki wyjaśnieniu zachodzących procesów, stwarzają również możliwości do zastosowania nowych substancji, które można zastosować w leczeniu. W rozprawie przedstawiono wpływ szeregu czynników na nasilenie zwłóknienia śródmiąższowego w nerce, a co za tym idzie na postęp progresji niewydolności nerek. Szczególną uwagę poświęcono płytkowo-pochodnemu czynnikowi wzrostowemu (PDGF), dopełniaczowi oraz układowi renina angiotensyna aldosteron (RAAS). W toku prac badawczych udowodniono wpływ przeciwciał blokujących PDGF-D, antagonistów receptora dla aktywnego czynnika 5 układu dopełniacza oraz blokerów receptora dla angiotensyny (ARB) w hamowaniu zwłóknienia śródmiąższowego.

W rozdziale poświęconym hamującemu wpływowi przeciwciał anti-PDGF-D na nasilenie zwłóknienia śródmiąższowego w nerce, zastosowano eksperymentalny model mezangialno – rozplemowego kłębuszkowego zapalenia nerek, wywołany podaniem przeciwciał anti-Th 1.1, ponadto wykonano jednostronną nefrektomię.

Zwierzęta u których wywołano nefropatię, podzielono na dwie grupy. W jednej stosowano w leczeniu przeciwciało CR002 – antagonistę PDGF-D, a w drugiej nieaktywne przeciwciała klasy IgG. Po wywołaniu choroby, przeciwciało blokujące działanie PDGF-D oraz placebo podawano w dniach 17, 28 oraz 35. Obserwację prowadzono przez 100 dni od początku choroby. Pozyskane tkanki poddano analizie pod kątem nasilenia zwłóknienia śródmiąszu. Oceniono nasilenie włóknienia przy zastosowaniu histochemicznego barwienia Sirius Red (SR), wykrywającego włókna kolagenowe, oraz barwień immunohistochemicznych wykrywających obecność kolagenów typu I, typu III, alfa-aktyny mięśni gładkich (alfa-SMA). Ponadto zastosowano barwienie pozyskanych tkanek w kierunku antygenów dla monocytów/makrofagów – ED1. Przy zastosowaniu reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR), oceniono stężenie mRNA dla kolagenu typu I oraz typu III. W badaniu w hodowli komórkowej, z zastosowaniem szczurzych nerkowych fibroblastów, wykazano, że dodanie PDGF-D nasila ich proliferację. Natomiast dodanie przeciwciał CR002 spowodowało zahamowanie tego efektu. Użycie przeciwciał hamujących PDGF-D wyrażało się, u zwierząt eksperymentalnych, statystycznie istotnym zmniejszeniem białkomoczu. Różnice stężeń kreatyniny w surowicy oraz współczynników filtracji kłębuszkowej, nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej, ze względu na bardzo dużą zmienność wewnątrzgrupową, jednakże dało się zaobserwować lepszą funkcję nerek u zwierząt leczonych CR002. Obserwacja ta potwierdziła się, gdy za wykładnik pogorszenia funkcji nerek, wzięto podwojenie stężenia kreatyniny. W takim ujęciu uwidoczono statystycznie niższą liczbę osobników, w grupie leczonej antagonistą PDGF-D, u których doszło do podwojenia stężenia kreatyniny. Mniejsze było także nasilenie uszkodzenia śródmiąszu, ocenione w skali półilościowej. W tkankach pobranych od zwierząt, u

których zastosowano inhibitor PDGF-D, zaobserwowano mniejsze nasilenie włóknienia w śródmiąszu, ocenione przy pomocy morfometrii komputerowej, przy użyciu barwienia SR oraz w przy zastosowaniu przeciwciał w kierunku kolagenów typu I i typu III. Podobny wynik osiągnięto analizując barwienia w kierunku wimentyny, świadczącej o procesie przekształcania się komórek mezangium w miofibroblasty. Nasilenie włóknienia mierzone przy zastosowaniu przeciwciał w kierunku alfa-SMA, również świadczące o procesie aktywacji komórek mezangium, było niższe o 33% w grupie leczonej CR002, jednakże nie uzyskano różnicy statystycznie istotnej. Udowodniono skuteczność terapii anty-PDGF-D w późnym okresie kłębuszkowych zapaleń nerek, o podłożu immunologicznym oraz jej pozytywny wpływ na zahamowanie białkomoczu i spowolnienie progresji niewydolności nerek. Efekt ten ma miejsce przede wszystkim przez zatrzymanie progresji włóknienia śródmiąszowego.

W kolejnym rozdziale zbadano wpływ składnika piątego dopełniacza (C5) na włóknienie śródmiąszowe. Zdecydowano o wybraniu modelu, w którym uszkodzenie nerek nie jest zależne od białkomoczu, czyli jednostronne zamknięcie moczowodu (UUO). W pierwszym etapie użyto myszy z defektem ekspresji C5 oraz odpowiednio dobranej grupy kontrolnej. W dniu rozpoczęcia eksperymentu, w obu grupach dokonano jednostronnego zamknięcia moczowodu. Połowę zwierząt z każdej grupy zgładzono w 5 dniu, resztę w 10 dniu. Stopień nasilenia włóknienia śródmiąszowego mierzono z zastosowaniem morfometrii komputerowej, przy pomocy barwienia SR. Ponadto przy użyciu immunohistochemii, oceniono nasilenie ekspresji alfa-SMA, kolagenu typu I oraz fibronektyny. Pobrane tkanki barwiono również przy zastosowaniu przeciwciał przeciwko antygenowi makrofagowemu (F4/80).

W dniu 5 eksperymentu zaobserwowano nasilone uszkodzenie śródmiąszu wśród zwierząt z grupy kontrolnej, wyrażające się wzrostem ekspresji kolagenu typu I, fibronektyny oraz alfa-SMA. Podobne efekty uwidoczniono przy zastosowaniu barwienia SR. Natomiast w grupie zwierząt z obniżoną ekspresją C5, uwidoczniono mniejsze uszkodzenie śródmiąszu wyrażające się w barwieniach SR, a także przeciwko kolagenowi typu I i fibronektynie. W dniu 10 powyższe zmiany utrzymywały się, różnice nie były jednak statystycznie istotne, za wyjątkiem barwienia przeciwko fibronektynie. Podobne rezultaty zaobserwowano badając mRNA przy użyciu RT-PCR. Statystycznie niższe były poziomy mRNA dla fibronektyny u zwierząt z defektem C5, niż w grupie kontrolnej, zarówno w dniu 5 jak i 10. Pomimo znacznej redukcji ekspresji mRNA dla kolagenu typu IV, w grupie z defektem C5, nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy, w porównaniu do grupy kontrolnej. Aktywacja fibroblastów i przejście komórek z formy nabłonkowej do mezenchymalnej (EMT), wyrażające się ekspresją alfa-SMA oraz wimentyny, były znacznie mniej nasilone u zwierząt z upośledzeniem funkcji C5 niż u tych z grupy kontrolnej. Również napływ makrofagów do śródmiąszu był mniejszy w grupie bez C5. Przy zastosowaniu RT-PCR uwidoczniono ponadto znaczne nasilenie, w grupie kontrolnej, ekspresji innych mediatorów włóknienia, tj. PDGF typu A, B i D. Brak ekspresji C5 wiązał się również z mniejszą gęstością podjednostki beta receptora dla PDGF. Również stężenie mRNA dla czynnika wzrostu guza (TGF-beta) było statystycznie istotnie niższe w grupie z defektem C5.

W drugim etapie eksperymentu zastosowano jednostronne zamknięcie moczowodu, a dodatkowo wszczepiono zwierzętom dootrzewnowo pompy podające w sposób ciągły inhibitor dla aktywnej formy czynnika 5 dopełniacza (C5a). W grupie kontrolnej zastosowano pompy dootrzewnowe zawierające placebo. Uwidoczniono mniejsze

nasilenie włóknienia, wyrażające się w barwieniach SR oraz przeciwko fibronektynie, w grupie otrzymującej inhibitor dla C5a. Podobne tendencje, jednakże bez statystycznej istotności, zaobserwowano w przypadku barwień przeciwko kolagenowi typu I oraz alfa-SMA. Nie zaobserwowano mniejszego napływu makrofagów. Przy użyciu RT-PCR uwidoczono mniejszą ekspresję mRNA dla PDGF-B oraz TGF-beta, wśród zwierząt otrzymujących inhibitor dla receptora C5a.

Podsumowując, stwierdzono iż niedobór C5, we wczesnej fazie schorzeń nerek, przebiegających bez białkomoczu, jest czynnikiem ochronnym i wpływa na zmniejszenie aktywacji fibroblastów, ograniczenie produkcji białek macierzy, mniejszy napływ makrofagów. Kluczową rolę odgrywa w tym procesie C5a mający właściwości anafilaktyczne.

W kolejnej części rozprawy przedstawiono wpływ blokera receptora dla angiotensyny II (ARB) – telmisartanu, na przebieg ostrej fazy, eksperymentalnie wywołanego, mezangialno – rozplemowego kłębuszkowego zapalenia nerek. W pracy tej posłużono się szczurzym modelem nefropatii mezangialno – rozplemowej, wywołanej przez podanie przeciwciał anti-Th1.1. Cztery dni po wywołaniu schorzenia, zwierzęta zostały przydzielone do jednej z czterech grup. Dwie grupy otrzymywały telmisartan, jedna w dawce 10 mg/kg mc. (HT – high telmisartan), druga w dawce 0,1 mg/kg mc (LT – low temisartan). Zwierzęta w kolejnych grupach otrzymywały wodę (CT – control) bądź hydrochlorotiazyd i hydralazynę (HCT+ H – hydrochlorotiazide + hydralazine). Między poszczególnymi grupami nie było różnic w odniesieniu do nasilenia białkomoczu oraz wartości ciśnienia tętniczego. Połowa zwierząt została zgładzona w dniu 9, pozostałe w dniu 14. Pobrane wycinki z nerek zostały ocenione pod kątem zaawansowania włóknienia przy pomocy barwień SR, a także immunohistochemicznie z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko alfa-SMA

oraz kolagenowi typu IV. Nie stwierdzono różnic między poszczególnymi grupami w stopniu uszkodzenia kłębuszków. W grupie HT, w obrębie kłębuszków, stwierdzono istotnie niższą ekspresję alfa-SMA. Ponadto niższe było zaawansowanie włóknienia oceniane przy pomocy barwienia SR, w grupie HT oraz LT. Z kolei w obrębie śródmiąższu, u zwierząt z grupy HT, uwidoczono mniejsze nasilenie ekspresji alfa-SMA. W przypadku barwienia SR mniejsze nasilenie włóknienia w śródmiąższu zaobserwowano zarówno w grupach HT jak i LT. Natomiast ekspresja kolagenu typu IV w istotnym stopniu była zmniejszona jedynie w grupie HT.

W powyższym badaniu stwierdzono hamujący wpływ wysokich dawek ARB na stopień włóknienia zarówno w obrębie kłębuszków nerkowych, a także w przestrzeni śródmiąższowej, co bezpośrednio przekłada się na zaawansowanie niewydolności całego narządu. Ochronny wpływ ARB polegał nie tylko na zahamowaniu powstawania różnych typów włókien kolagenowych, lecz także na zatrzymaniu aktywacji miofibroblastów. Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż efekt ochronny ARB był niezależny od stopnia redukcji białkomoczu oraz wartości ciśnienia tętniczego krwi. W grupie HCT+H osiągnięto porównywalne obniżenie białkomoczu oraz zmniejszenie się ciśnienia tętniczego, co nie przełożyło się na zmniejszenie zaawansowania włóknienia zarówno w obszarze kłębuszków, jak i śródmiąższu.

W kolejnym etapie badania wpływu blokady układu RAAS, ponownie zastosowano zwierzęcy model mezangialno – rozplemowego kłębuszkowego zapalenia nerek, wywołując uszkodzenie nerek przez podanie przeciwciał anti-Th 1.1, dodatkowo również wykonano jednostronną nefrektomię. Ze względu na chęć poznania mechanizmów zachodzących w późnej fazie choroby, leczenie rozpoczęto 28 dni po jej indukcji. Zwierzęta eksperymentalne przydzielono do jednej z

następujących grup: grupa kontrolna (CT) – bez leczenia, grupa otrzymująca telmisartan w dawce 0,1 mg/kg (LT), kolejna grupa otrzymywała telmisartan w dawce 1 mg/kg (HT). Ponadto utworzono 2 grupy, które otrzymywały leczenie przeciw nadciśnieniowe, przy zastosowaniu leków innych niż blokery receptora angiotensynowego lub inhibitorów konwertazy angiotensyny, tj. z zastosowaniem hydrochlorotiazydu i hydralazyny (HCT+H) oraz atenololu (AT). Eksperyment prowadzono przez 131 dni od momentu wywołania choroby. Wśród zwierząt otrzymujących telmisartan w wysokiej dawce, zaobserwowano najniższe wartości ciśnienia tętniczego, najniższy białkomocz oraz najwolniejszy postęp niewydolności nerek. W grupie HT wykazano mniejsze nasilenie włóknienia śródmiąższowego, zobrażonego przy zastosowaniu barwienia SR, ponadto niższa była również ekspresja kolagenu typu I, w barwieniach immunohistochemicznych. Podobny efekt, jednakże o mniejszym nasileniu, osiągnięto w grupie LT. Zaobserwowano niższą ekspresję desminy w grupie otrzymującej telmisartan w dużej dawce. Podobne rezultaty uzyskano dzięki analizie mRNA metodą RT-PCR. Stężenia mRNA dla kolagenu typu I oraz typu III były najniższe w grupie HT. Dodatkowo przy pomocy RT-PCR uwidoczniono niższą ekspresję podjednostek alfa i beta receptora dla płytkowopochodnych czynników wzrostu, których profibrotyczne oddziaływanie zostało udowodnione w poprzednich publikacjach. W powyższej publikacji wykazano ochronną rolę blokady receptora dla angiotensyny II, w hamowaniu rozwoju oraz progresji włóknienia śródmiąższowego, w zaawansowanej fazie rozwoju glomerulopatii. Efekt ten był niezależny od stopnia obniżenia ciśnienia tętniczego. Efekt ten prawdopodobnie można wyjaśnić hamującym wpływem ARB na podjednostki receptora dla różnych form PDGF.

Powyżej zaprezentowane prace przedstawiają różne mechanizmy powstawania i progresji włóknienia śródmiąższowego w nerce, a co za tym idzie upośledzenia funkcji narządu. Przedstawiono nie tylko drogi nasilające doprowadzające do akumulacji białek macierzy odpowiadających za stopień zwłóknienia, ale także przebadano trzy substancje odpowiadające za zahamowanie tych procesów. Udowodniono potencjalnie ochronny efekt zastosowania blokady receptora dla C5a oraz przeciwciał blokujących receptor dla PDGF-D. W przypadku ARB udowodniono ich protekcyjny wpływ na włóknienie śródmiąższowe, niezależny od stopnia obniżenia ciśnienia tętniczego, a także wykazano ich wpływ na receptor dla PDGF, jako jedną z potencjalnych dróg zahamowania włóknienia śródmiąższowego.

Stopień włóknienia śródmiąższu jest jednym z zasadniczych czynników progresji PChN, mający częstokroć większy wpływ na stopień niewydolności nerki niż uszkodzenia w obrębie kłębuszków. Jednakże ubytek liczby kłębuszków ma również zasadniczą rolę w upośledzeniu współczynnika filtracji kłębuszkowej. W skład błony filtracyjnej kłębuszka nerkowego wchodzi komórki śródbłonka naczyń, błona podstawna oraz spoczywające na niej komórki nabłonka trzewnego zwane podocytami. Udowodniono iż uszkodzenia podocytów, powodujące zmianę konformacji białek szkieletowych wywołują zmianę ich kształtu oraz osłabienie wiązań zarówno z błoną podstawną, jak i sąsiadującymi komórkami. Powoduje to iż komórki te dostają się do przestrzeni moczowej i są wydalane z moczem. Z kolei odsłonięte fragmenty błony podstawnej przestają spełniać swoją dotychczasową rolę. Dochodzi do „przeciekania” białek osocza do śródmiąższu, co zapoczątkowuje kaskadę procesów immunologicznych, podczas których dochodzi m. im. do aktywacji białek dopełniacza oraz napływu komórek procesu zapalnego, co w konsekwencji prowadzi do produkcji i odkładania się białek macierzy pozakomórkowej. W obrębie

samego kłębuszka również zachodzą procesy, mające na celu regenerację powstałego ubytku w błonie filtracyjnej. Biorą w tym udział komórki nabłonka ściennego (PEC), wyścielające torebkę Bowmanna. Postuluje się iż PEC mają potencjał komórek macierzystych i mogą z nich różnicować się podocyty. W wyniku zachodzących procesów dochodzi do powstawania zrostów między błoną podstawną a torebką, co jest jedną z charakterystycznych cech dla ogniskowego segmentalnego stwardnienia kłębuszków nerkowych (FSGS). Udowodniono również iż wydalone z moczem podocyty są żywe i dają się hodować w warunkach laboratoryjnych. Ponadto liczba komórek w osadzie moczu, wykazujących dodatnią reakcję, z jednym z najbardziej charakterystycznych dla podocytów antygenów – podokaliksynam (PDX), koreluje z aktywnością zarówno pierwotnych, jak i wtórnych kłębuszkowych zapaleń nerek. Wykazano także, iż liczba podocytów w osadzie moczu, lepiej koreluje z aktywną fazą choroby, niż białkomocz. Zauważono iż narastająca liczba komórek w osadzie moczu wiąże się z obecnością aktywnych procesów immunologicznych zachodzących w obrębie kłębuszka. Zmiany te wyprzedzają pojawienie się białkomoczu, będącego odzwierciedleniem uszkodzenia błony filtracyjnej. W dalszym etapie dochodzi do spadku liczby podocytów, które są tracone z moczem, a jednocześnie stężenie białka w moczach utrzymuje się na stałym poziomie.

Ponieważ liczba podocytów w osadzie moczu koreluje z nasileniem procesów zachodzących w kłębuszkach, a co za tym idzie ma pośredni związek z ubytkiem filtracji kłębuszkowej, w ostatnim fragmencie rozprawy, postanowiono zbadać wartość prognostyczną podocyturii na postęp niewydolności narządu.

Do badania włączono 40 pacjentów z rozpoznaniem biopsyjnie FSGS, u których w momencie rozpoznania zaobserwowano wyrażający się stosunkiem stężeń białka do kreatyniny w moczach większym niż 2. Pacjenci pozostawali w 36-miesięcznej

obserwacji. U każdego chorego, w momencie włączenia do badania, wykonywano badanie na obecność podocytów w moczu. Oprócz standardowo stosowanego do identyfikacji podocytów PDX, wykonano również barwienia w kierunku antygenu makrofagowego CD68 oraz proliferacyjnego Ki67.

W przebiegu obserwacji remisję białkomoczu wykazano u 63% badanych. Nie stwierdzono natomiast różnicy między stężeniami kreatyniny w momencie rozpoczęcia badania między osobami, u których remisja wystąpiła w odniesieniu do tych u których nie wystąpiła. Pacjenci u których doszło do wystąpienia remisji, na początku choroby mieli porównywalny białkomocz z tymi, u których nie uległ on istotnemu zmniejszeniu.

Z kolei pogorszenie funkcji filtracyjnej nerek, wyrażające się podwojeniem stężenia kreatyniny w surowicy, zaobserwowano u 45% badanych. U pacjentów, u których doszło do wzrostu kreatyniny, nie wykazano wyższego wyjściowego stężenia kreatyniny ani większego nasilenia białkomoczu., w porównaniu do tych u których funkcja nerek pozostała stabilna.

Badając w osadzie moczu, komórki wykazujące dodatnią reakcję w kierunku PDX, nie stwierdzono różnicy w ich liczbie między osobami, u których pod koniec obserwacji funkcja nerek uległa pogorszeniu w odniesieniu do tych, u których była ona prawidłowa. Podobną prawidłowość zauważono także porównując osoby, u których doszło i nie doszło do remisji białkomoczu. Analizując model regresji logistycznej, nie stwierdzono, by liczba komórek PDX+ w osadzie moczu, miała wartość predykcyjną dla pogorszenia się funkcji nerek. Z kolei po przeanalizowaniu komórek wykazujących dodatnią reakcję z antygenem makrofagowym CD68 wykazano, iż ich liczba na początku badania miała wartość predykcyjną dla podwojenia się stężenia kreatyniny w 36-miesięcznej obserwacji. Natomiast w

odniesieniu do komórek w osadzie moczu z dodatnią reakcją w kierunku antygenu Ki67, zauważono iż ich liczba jest statystycznie istotnie wyższa u osób, u których doszło do wzrostu stężenia kreatyniny. Również w grupie osób, u których nie doszło do wystąpienia remisji białkomoczu, wyjściowa liczba komórek była wyższa. Po analizie z użyciem regresji logistycznej stwierdzono znaczenie predykcyjne komórek Ki67 w prognozowaniu progresji nefropatii.

W przebiegu, powyższego badania potwierdzono związek komórek PDX+, izolowanych z osadu moczu z aktywnością choroby. Jednakże nie udało się wykazać ich wartości predykcyjnej w przewidywaniu pogorszenia funkcji narządu. W świetle innych doniesień, mówiących o tym iż w osadzie moczu mogą znajdować się, oprócz podocytów, także i inne komórki wykazujące reakcję z PDX, tj. PEC. Komórki te są wyrazem próby regeneracji powstałych, na skutek utraty podocytów, ubytków w błonie filtracyjnej. Jednakże paradoksalnie okazało się, iż aktywacja PEC, mająca na celu regenerację błony filtracyjnej wywołuje nasilenie włóknienia w obrębie kłębuszków. Niejako poparciem powyższej hipotezy są wyniki analizy regresji logistycznej dla komórek CD68+ oraz Ki67+. Komórki wykazujące aktywność proliferacyjną, nie miały żadnych innych cech charakterystycznych dla podocytów bądź PEC, należy przypuszczać iż są to w komórki o fenotypie pośrednim między wyżej wymienionymi typami komórek kłębuszka nerkowego, a ich obecność świadczy o nasilonych procesach mających na celu regenerację ubytków błony filtracyjnej. Udowodniono, iż komórki te mają zdolność do nasilania produkcji elementów macierzy pozakomórkowej, takich jak kolageny typu I i IV oraz fibronektyna.

W wyniku prac przedstawionych w ostatnim rozdziale udowodniono związek między liczbą komórek prezentujących antygen makrofagowy lub proliferacyjny a

pogorszeniem funkcji nerek, u pacjentów z FSGS. Zależności takiej nie udało się udowodnić dla komórek PDX+ w osadzie moczu, mimo iż są one wyrazem aktywności choroby.

Podsumowując, w powyższej rozprawie wykazano mechanizmy wpływające na nasilenie włóknienia śródmiąższowego w nerce, a co za tym idzie na postęp niewydolności narządu. W szczególności zbadano mechanizmy związane z PDGF-D, układem dopełniacza oraz RAS. Przedstawiono wyniki zastosowania przeciwciał anty PDGF-D, blokera receptora dla C5a oraz ARB na zahamowanie progresji włóknienia śródmiąższowego. Natomiast w ostatnim rozdziale wykazano związek między komórkami posiadającymi antygeny makrofagowe lub proliferacyjne w progresji PChN, na przykładzie chorych z FSGS.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych (artystycznych).

- Współautorstwo 24 prac prezentowanych na zjazdach Amerykańskiego Towarzystwa Nefrologicznego (ASN), Światowego Kongresu Nefrologicznego (WCN), Europejskiego Towarzystwa Nefrologicznego (ERA-EDTA), Niemieckiego Towarzystwa Nefrologicznego, Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego (PTN), Europejskiego Towarzystwa Chorób Płuc (ERS), Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego (PTK)
- Prowadzenie zajęć ze studentami English Division Akademii Medycznej we Wrocławiu, z przedmiotu Immunologia, w latach 2008-2010.
- Udział w programie WROVASC – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo Naczyniowej we Wrocławiu, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Projektu Innowacyjna Gospodarka na lata 2007 – 2013. W ramach tego projektu jestem głównym badaczem zadania nr 4, zajmującego się oceną podocytów wydalanych z moczu u pacjentów z pierwotnymi kłębuszkowymi zapaleniami nerek.

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie