

prof.dr hab.n.med. Krystyna Olczyk
Katedra i Zakład Chemii Klinicznej
i Diagnostyki Laboratoryjnej
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu

Recenzja

rozprawy doktorskiej p.t.: „SDS elektroforeza jako narzędzie do analizy białkomoczu”, wykonanej przez Panią mgr Paulinę Mazur, pod kierunkiem Promotora – Pana dr hab. n.med. Ryszarda Drożdża, oraz Promotora pomocniczego – Pani dr n.med. Pauliny Dumnickiej.

Białkomocz, oznaczający nadmierną utratę białka z moczem, jest głównym objawem choroby nerek, będąc przy tym niezależnym wskaźnikiem prognostycznym postępującego upośledzenia ich czynności, nie wyłączając niewydolności schyłkowej. Co więcej, białkomocz stanowi także niezależny, silny czynnik ryzyka wystąpienia ostrych zespołów wieńcowych, zdarzeń naczyniowo-mózgowych, zawału serca i zgonu. Wykazano ponadto, iż już mikroalbuminuria nasila ryzyko wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego, udaru mózgu i zgonu, będąc wyrazem uogólnionego uszkodzenia śródbłonka naczyniowego. Nadmierna utrata białka z moczem to jednocześnie najważniejszy – z punktu widzenia rozpoznania chorób nerek, wskaźnik ich uszkodzenia. Zagadnienia oceny użyteczności uznanych markerów laboratoryjnych ostrego uszkodzenia nerek i przewlekłej ich niewydolności, w tym białkomoczu, oraz – weryfikacja laboratoryjnej przydatności zróżnicowanych narzędzi biochemicznych w diagnostyce wymienionych patologii to jedne z kierunków badawczych Zespołu kierowanego przez Pana dr hab. Ryszarda Drożdża. Także i oceniana rozprawa wpisuje się w wymieniony wyżej aspekt aktywności naukowo-badawczej Zakładu Diagnostyki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego CMUJ. Dlatego też, wybór tematu dysertacji uważam za uzasadniony i w pełni nadający się na przedmiot pracy doktorskiej.

Oceniana rozprawa obejmuje 159 stron tekstu wraz z piśmiennictwem, spisem rycin i tabel. Posiada typowy układ rozdziałów, z zachowaniem właściwych pomiędzy nimi proporcji. Zawiera 5 tabel i 69 rycin. Wprowadzeniem do rozprawy jest *Alfabetyczny spis skrótów i pojęć*.

Rozdział *Wstęp* poświęcony jest w swej pierwszej części charakterystyce białkomoczu, obejmującej omówienie patofizjologii tego zaburzenia i jego licznych rodzajów, takich jak białkomocz kłębuszkowy, cewkowy, mieszany, nadmiarowy, sekrecyjny, pozanerkowy, czynnościowy i ortostatyczny. W dalszej części rozdziału Autorka przedstawia wyczerpujące informacje na temat diagnostyki białkomoczu, w tym – badań przesiewowych (półilościowych), tj. testów paskowych i precypitacyjnych, oraz – na temat badań ilościowych, obejmujących metody turbidymetryczne, nefelometryczne i kolorymetryczne, opisując także metody immunochemiczne, w tym test immunoenzymatyczny ELISA i metodę Western Blot. W kolejnych podrozdziałach *Wstępu* Doktorantka opisuje systemy elektroforetyczne, takie jak elektroforeza na żelach agarozowych, immunofiksacja, SDS elektroforeza i elektroforeza kapilarna. Swoją uwagę skupia także na omówieniu składu białek moczu, opisując białka drobnocząsteczkowe, białka o średniej masie cząsteczkowej i białka o wysokiej masie cząsteczkowej. Ostatnią część *Wstępu* poświęca omówieniu innych, aniżeli wymienione, markerów uszkodzenia nerek, takich jak lipokalina neutrofilowa związana z żelatynazą neutrofilii (NGAL), cząsteczka-1 uszkodzenia nerek (KIM-1), interleukina 18 (IL-18), wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (L-FABP), panel NephroCheck pozwalający na jednoczesne oznaczanie białka

wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu 7 (IGFBP-7) oraz tkankowego inhibitora metaloproteinaz 2 (TIMP -2), oraz – panel Bio-Plx Pro RBM Human Kidney Toxicity Assays pozwalający na jednoczesne oznaczanie 12 markerów ostrego uszkodzenia nerek, tj. NGAL, KIM-1, IL-18, albuminy, β_2 -mikroglobuliny, cystatyny C, białka chemotaktycznego dla monocytów-1 (MCP-1), S-transferazy glutationowej Pi (GST- π), czynnika TTF3, osteopontyny, kalbindyny oraz klasteryny. Przedstawione we *Wstępie* zagadnienia świadczą o wiedzy Doktorantki, jak i o umiejętności wyboru tych zagadnień, jakie wiążą się z tematem pracy. Pragnę podkreślić, iż treść omawianego rozdziału dysertacji zasługuje na upowszechnienie w formie pracy pogładowej, która byłaby przydatna zarówno w procesie kształcenia przyszłych adeptów zawodu lekarza i diagnosty laboratoryjnego, oraz w procesie szkolenia podyplomowego absolwentów wymienionych kierunków medycznych. Zamieszczenie w tekście omawianego rozdziału pracy 18 rycin oraz dwóch tabel, ułatwia lekturę tej części dysertacji. Zakończeniem rozdziału *Wstęp* jest *Podsumowanie*, wprowadzające czytelnika w założenia i zakres pracy badawczej ocenianej rozprawy, które to kwestie znalazły odzwierciedlenie w kolejnym rozdziale dysertacji, tj. w *Celu pracy*.

Cel pracy jest jasno sformułowany, a jego wybór przekonująco uzasadniony. Doktorantka postanowiła poddać ocenie możliwość wykorzystania elektroforezy SDS jako narzędzia do jakościowej i ilościowej charakterystyki białkomoczu, prowadzonej w medycznym laboratorium diagnostycznym. Jej zdaniem, opartym na wcześniejszych doświadczeniach badawczych i gruntownym przeglądzie piśmiennictwa, wspomniana technika badawcza wydaje się spełniać warunki, niezbędne ze strony potencjalnych markerów uszkodzenia nerek. Dla realizacji nadrzędnego celu pracy Doktorantka zaplanowała szereg zadań badawczych, takich jak: zbadanie wpływu usieciowania żeli poliakrylamidowych na możliwości analizy białek moczu; - określenie czułości analitycznej metody w zestawieniu z wartościami referencyjnymi wybranych białkowych markerów proteinurii; - ocena użyteczności SDS elektroforezy jako narzędzia do półilościowego oznaczania wybranych białek; - identyfikacja lokalizacji wybranych markerów uszkodzenia nerki w profilach elektroforetycznych i dokonanie opisu typowych proteinurii; - ocena SDS elektroforezy jako narzędzia służącego do określania typu białkomoczu i wykrywania uszkodzeń różnych struktur nerki.

Na przeprowadzenie badań uzyskana została zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Materiałem do badań były próbki moczu pozyskane od anonimowych, dorosłych pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, pozostałe po przeprowadzeniu u wspomnianych osób, rutynowych badań diagnostycznych. Doktorantka poddała badaniom ponad 600 próbek moczu, w tym: 94 próbki z prawidłowym wynikiem badania ogólnego moczu, 300 próbek moczu chorych z białkomoczem o różnym nasileniu i zróżnicowanym GFR, 10 próbek wykazujących nieprawidłowości w badaniu ogólnym moczu, oraz 200 próbek moczu pacjentów z gammopatiami monoklonalnymi. Zastosowała następujące procedury badawcze: SDS elektroforezę, z wykorzystaniem sporządzonych we własnym zakresie 12,5%, 16% i 20% żeli poliakrylamidowych, oraz – komercyjnie dostępnych żeli gradientowych firmy Sigma Aldrich; - metodę Western Blot; - ilościowe metody immunochemiczne, obejmujące ocenę stężenia w moczu białka całkowitego, albuminy, β_2 -mikroglobuliny, wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin, uromoduliny, oraz – ocenę stężenia kreatyniny w surowicy krwi i w moczu. Doktorantka wyliczała także wskaźnik przesączania kłębuszkowego GFR, stosując skrócony wzór MDRD, celem oceny stopnia zaawansowana przewlekłej choroby nerek.

Pragnę podkreślić, iż realizacja części doświadczalnej pracy wymagała dużej wiedzy i praktycznych umiejętności Doktorantki, które z pewnością nabyła pracując pod kierunkiem Pana dr hab. Ryszarda

Drożdża, którego osiągnięcia w zakresie tematyki ocenianej rozprawy doktorskiej są powszechnie znane. Szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych oraz warunków prowadzenia analiz zamieściła Doktorantka w starannie opracowanym rozdziale *Materiał i metody*.

Wyniki badań zostały wyczerpująco opisane, oraz przedstawione na 29 rycinach i w 2 tabelach. Treść omawianego rozdziału rozprawy wskazuje, iż cel pracy doktorskiej został w pełni zrealizowany. Doktorantka wykazała, iż elektroforetyczny rozdział białek przy zastosowaniu SDS elektroforezy umożliwia dokonanie zaawansowanej diagnostyki przyczyn białkomoczu. Potwierdziła, iż SDS elektroforeza białek moczu, prowadzona na usieciowanych gradientowych żelach poliakrylamidowych, umożliwia półilościową analizę kilkunastu białek równocześnie. Zidentyfikowała frakcje białkowe związane ze znanymi markerami białkowymi proteinurii oraz dokonała opisu elektroforetycznego profilu białkowych, związanych z kliniczną klasyfikacją białkomoczu. Wykazała ponadto, iż: - SDS elektroforeza cechuje się dostateczną czułością diagnostyczną; - w próbkach moczu, o niskim stężeniu białka, uznanym za prawidłowy, po zastosowaniu metody ultrafiltracji, występują białka drobnocząsteczkowe, których obecność wskazywać może na rozpoczynającą się chorobę nerek; - w moczu pacjentów z gammapatią monoklonalną występują – obok łańcuchów lekkich immunoglobulin, białka drobnocząsteczkowe lub wielkocząsteczkowe, co odzwierciedla uszkodzenie cewek lub kłębuszków nerkowych; - u osób zdrowych stężenie białka całkowitego i albuminy w moczu jest niższe, aniżeli wskazują obowiązujące wartości referencyjne; - istnieją różnice w profilach elektroforetycznych białkomoczu cewkowego, co pozwoliło na wyodrębnienie dwóch typów białkomoczu cewkowego (typu: *upper* – charakteryzującego się obecnością w moczu białek o m.cz. równej lub wyższej od 20 kDa i typu: *lower* – charakteryzującego się obecnością w moczu białek o m.cz. niższej niż 20 kDa) i wskazanie związku każdego z tych dwóch typów białkomoczu z wartością GFR, odzwierciedlającego różne mechanizmy uszkodzenia nefronu.

Interpretacji i szczegółowego omówienia wyników badań – zilustrowanego 14 rycinami – dokonała Doktorantka w rozdziale *Dyskusja*. Ten rozdział pracy świadczy o dużej wiedzy Doktorantki w zakresie zagadnień, będących przedmiotem Jej naukowych dociekań, jak również – o umiejętności krytycznego oceniania własnych dokonań badawczych. W tekście omawianego rozdziału dysertacji Doktorantka wskazuje, iż SDS elektroforeza białek moczu pozwala na wczesne wykrycie i rozpoznanie ważnych z klinicznego punktu widzenia typów białkomoczu, a w szczególności – kłębuszkowego i cewkowego. Podkreśla, iż metoda ta stanowić może narzędzie do wykonywania tzw. nieinwazyjnej ciekłej biopsji, umożliwiając zobrazowanie różnic w proporcji poszczególnych białek w moczu, w stosunku do proporcji ich stężenia we krwi, i odzwierciedlając tym samym uszkodzenia cewek nerkowych na poziomie komórkowym. Wskazuje, iż zastosowanie tej metody umożliwić może ukierunkowanie i znaczące skrócenie procesu diagnostycznego, a poprzez odzwierciedlenie w elektroforetycznym obrazie, profilu kilkunastu jednocześnie markerów białkowych – stworzenie możliwości postawienia we wstępnym etapie procesu diagnostycznego, nie rozważanych wcześniej hipotez. Choć w końcowej części dysertacji Doktorantka stwierdza, iż „SDS elektroforeza, pomimo swojej użyteczności we wstępnym wykrywaniu, różnicowaniu oraz monitorowaniu zarówno chorób nerek, jak i chorób ogólnoustrojowych, pozostaje niedocenionym narzędziem w laboratoryjnej diagnostyce chorób nerek”, to przeprowadzone przez Nią badania wskazują nowe perspektywy w diagnostyce wymienionych wyżej schorzeń. Dlatego też, zachęcam Autorkę pracy do opublikowania, a w ten sposób – do upowszechnienia uzyskanych wyników, w specjalistycznym, renomowanym czasopiśmie naukowym, by wskazać nowe drogi postępowania diagnostycznego, bowiem diagnostyka białkomoczu pozostaje jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej nefrologii.

Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę są w pełni zgodne z uzyskanymi wynikami, stanowią wyraz realizacji zaplanowanych zadań badawczych.

Piśmiennictwo, liczące 189 pozycji, obejmuje w zdecydowanej większości (79%) publikacje anglojęzyczne. 46 pozycji piśmiennictwa (24%) pochodzi z ostatnich pięciu lat, a z ostatniej dekady – łącznie 79 pozycji (42% wszystkich zamieszczonych w wykazie piśmiennictwa prac). Wszystkie pozycje literaturowe spisu piśmiennictwa zostały wykorzystane w tekście pracy.

Treść dysertacji kończy syntetycznie zredagowane *Streszczenie*, opracowane w polsko – i anglojęzycznej wersji.

Z obowiązku recenzenta pozwalam sobie wskazać kilka elementów, które powinny być wzięte pod uwagę przy przygotowywaniu pracy do druku.

- rozdział *Wstęp*: określenie: „kwaśny α_1 - glikoproteid” proponuję zamienić na „kwaśną α_1 - glikoproteinę”, str. 10; białka drobnocząsteczkowe – w procesie filtracji kłębuszkowej – przechodzą przez błonę filtracyjną, a nie jedynie przez podstawną (choć ta ostatnia jest oczywiście składnikiem błony filtracyjnej) str. 14, 37, 39 i 43; - określenie: „syntezować” proponuję zamienić na „syntetyzować”, str.33, 39 i 49.

- rozdział *Materiał i metody*: w podrozdziale 3.1. *Materiał badany*: brak jest wzmianki na temat surowicy krwi, w której oznaczano stężenie kreatyniny. Informacja o oznaczaniu tego wskaźnika – w surowicy krwi i w moczu – pojawia się w podrozdziale 3.2.3. *Ilościowe metody immunochemiczne*, a dopiero kolejny podrozdział, 3.2.4. p.t.: *Wskaźnik przesączania kłębuszkowego* stanowi uzasadnienie oznaczania stężenia kreatyniny w surowicy krwi. Ponadto, dopiero w rozdziale *Dyskusja* pojawia się informacja w wykorzystaniu wyników oznaczeń stężenia kreatyniny w moczu, celem określenia wartości współczynników ACR i PCR; - z jakiego powodu zastosowane w metodzie Western Blot przeciwciała pierwszorzędowe, takie jak królicze anty- β_2 -mikroglobulina, a także – królicze anty-RBP, pochodzą od dwóch producentów, tj. firmy Bioassay Technology Laboratory oraz firmy Merck (wskazane różnice dotyczą temperatury przechowywania przeciwciał: -20°C lub 4°C), podczas gdy każde z trzech pozostałych przeciwciał pochodzi tylko od jednego producenta (w każdym przypadku przechowywane w temp. 4°C).

- rozdział *Dyskusja*: proponuję zastąpienie stwierdzenia: „Mioglobinuria” jest wysoce nefrotoksyczna, stwierdzeniem: „Mioglobina” jest wysoce nefrotoksyczna (str. 114); proponuję także zastąpienie określenia: „poziom” kreatyniny, czy „poziom” białka całkowitego, określeniem: „stężenie” kreatyniny i „stężenie” białka całkowitego (str. 119 i 120).

- rozdział *Piśmiennictwo*: - zamienne stosowanie skrótów nazw czasopism z nazwami pełnymi; - pisanie z dużej litery wszystkich wyrazów tytułu danej pracy (np. poz. 63); - podawanie polskojęzycznej wersji tytułu artykułu zamieszczonego w czasopiśmie anglojęzycznym (np. poz. 60 i 75); - podawanie anglojęzycznej wersji nazwy polskiego czasopisma (np. poz. 144).)

Wymienione w recenzji uwagi, o charakterze wyłącznie redakcyjnym, zatem nie mające wpływu na wartość merytoryczną recenzowanej pracy, nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny tej rozprawy.

Reasumując stwierdzam, iż Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Mazur, nosząca tytuł: „SDS elektroforeza jako narzędzie do analizy białkomoczu”, spełnia warunki określone w art.13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca

2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789). Ma charakter poznawczy, lecz przede wszystkim aplikacyjny. Świadczy o dużej wiedzy Doktorantki, Jej manualnych umiejętnościach i znajomości nowoczesnych technik laboratoryjnych.

Z pełnym więc przekonaniem przedkładam Panu dr hab. Marcinowi Waligórze, prof. UJ – Przewodniczącemu Rady Dyscypliny Nauki o Zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Mazur do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, uprzejmie przedkładam wniosek o wyróżnienie ocenianej dysertacji, która:

1. znacznie przekracza przeciętny poziom rozpraw doktorskich z zakresu nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Głównym walorem rozprawy jest jej wartość aplikacyjna, jako opracowania wnoszącego oryginalny i znaczący wkład do współczesnej diagnostyki laboratoryjnej chorób nerek, poprzez wykazanie i potwierdzenie przydatności jednej z technik analitycznych, tj. SDS elektroforezy we wczesnym wykrywaniu i rozpoznawaniu klinicznie istotnych typów białkomoczu, którego diagnostyka pozostaje jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej nefrologii. Należy bowiem podkreślić, iż coraz bardziej dostępne i precyzyjne metody diagnostyki laboratoryjnej stwarzają możliwość identyfikowania prawdziwych przyczyn danego schorzenia. Niewątpliwie, oceniana dysertacja, oparta na rzetelnej i złożonej, biochemicznej analizie kilkuset prób materiału biologicznego (moczu) stanowi cenny i wiarygodny wkład do panelu badań laboratoryjnych, stosowanych w diagnostyce nefrologicznej
2. jest dobrze zaplanowanym, oryginalnym i opartym na rzetelnej analizie piśmiennictwa opracowaniem naukowym, starannie przygotowanym warsztatowo, i opartym o nowoczesne techniki laboratoryjne

prof. dr hab. n. med. Krystyna Olczyk