

Prof. dr hab. Barbara Dołęgowska
Katedra Mikrobiologii, Immunologii
i Medycyny Laboratoryjnej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Al. Powstańców Wlkp. 72
70-111 Szczecin
Tel.: 697 909 238
E-mail: barbara.dolegowska@pum.edu.pl

Szczecin, 13.05.2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Mgr Pauliny Mazur pt.
„SDS elektroforeza jako narzędzie do analizy białkomoczu”**

Promotor: Dr hab. Ryszard Drożdż

Promotor pomocniczy: Dr Paulina Dumnicka

Białkomocz jest objawem chorób układu moczowego oraz wielu nieprawidłowości o charakterze ogólnoustrojowym. Metody wykorzystywane do rutynowego oznaczania białek w moczu charakteryzują się niską czułością analityczną i co więcej, nie pozwalają na identyfikację pojedynczych białek, mogących wskazywać na bezpośrednią przyczynę białkomoczu i zaawansowanie choroby. Diagnostyka laboratoryjna chorób nerek, najczęstszej przyczyny białkomoczu, opiera się na oznaczeniach białka całkowitego i albuminy, których wyniki odnosi się do stężenia kreatyniny w pojedynczej próbce moczu. Analiza jakościowa białkomoczu pozwalająca na rozróżnienie jego bezpośredniego źródła i/lub przyczyny opiera się na metodach elektroforetycznych. Ich uzupełnieniem są metody immunochemiczne i chromatograficzne umożliwiające identyfikację poszczególnych białek.

Problem badawczy podjęty przez panią Mgr Paulinę Mazur, czyli opisanie metody, która mogłaby być wykorzystywana w rutynowym laboratorium diagnostycznym do jakościowej i ilościowej analizy białkomoczu, jest bardzo ważny i aktualny.

Praca została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana. Rozprawa ma typowy układ, na który składają się: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. Rozprawa została przedstawiona na 159 stronach, zawiera 69 rycin i 5 tabeli. Pomiędzy poszczególnymi częściami pracy zostały zachowane właściwe proporcje. Rozprawa została napisana bardzo starannie. Spisy treści, tabel i rycin umożliwiają jej szybkie przeglądanie i powrót do najbardziej interesujących fragmentów.

Wstęp został poświęcony omówieniu zagadnień związanych z tematem pracy oraz uzasadnieniu celowości podjętych badań. Autorka bardzo szczegółowo opisała wszystkie

rodzaje i przyczyny białkomoczu, a także metody ich diagnostyki – półilościowe badania przesiewowe, metody ilościowe oznaczania stężenia białka całkowitego i białek pojedynczych oraz metody służące do rozdzielania mieszanin białek i ich identyfikacji. Doktorantka w pierwszej części swojej pracy przedstawiła także najważniejsze białka, które mogą się pojawić w moczu, wskazała i scharakteryzowała markery uszkodzenia nerek.

Wstęp został wzbogacony rycinami i tabelami. Wydaje się, że do ryciny 4 obrazującej powstawanie białkomoczu nadmiarowego wkraść się błąd (w przesączu kłębuszkowym są 2 mg/24 godz., z czego 10 mg/24 godz. ulega wchłonięciu i 390 mg/24 godz. znajduje się w moczu ostatecznym)? Na stronie 44 w części poświęconej podjednostkom hemoglobiny przedostającym się do moczu, wśród przyczyn wymienione zostały hemoliza wewnątrznacyniowa, odczyny poprzetoczeniowe oraz zespół zmiążdżenia. Ten ostatni jest przyczyną pojawienia się w moczu mioglobiny.

Celem rozprawy była ocena możliwości wykorzystania SDS elektroforezy jako narzędzia do jakościowej oraz ilościowej charakterystyki białkomoczu w rutynowym laboratorium diagnostycznym. Doktorantka zaplanowała badania wpływu usieciowania żeli poliakrylamidowych na możliwości analizy białek moczu, oznaczenie czułości analitycznej metody w zestawieniu z wartościami referencyjnymi wybranych białkowych markerów proteinurii, ocenę użyteczności SDS elektroforezy jako narzędzia do półilościowego oznaczania wybranych białek, przeprowadzenie identyfikacji lokalizacji wybranych markerów uszkodzenia nerki w profilach elektroforetycznych typowych proteinurii oraz ocenę SDS elektroforezy jako narzędzia diagnostycznego służącego do analizy typu białkomoczu i wykrywania uszkodzeń różnych struktur nerki.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera opis materiału badanego, który stanowiły próbki moczu od dorosłych pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Między innymi do badań wykorzystano „10 próbek z nieprawidłowościami w badaniu ogólnym moczu” – brakuje opisu rodzaju nieprawidłowości. Procedury badawcze, z których korzystała Doktorantka zostały opisane bardzo szczegółowo co pozwoli przyszłym badaczom powtórzenie i/lub kontynuowanie badań zrealizowanych przez Autorkę.

Poszczególne etapy pracy zaplanowane i zrealizowane przez panią Mgr Mazur wymagały bardzo dobrej znajomości warsztatu badawczego. Pewien niedosyt budzi jednak brak informacji czy kolejne etapy badań były realizowane jednorazowo czy były powtórzone – ile razy?

W rozdziale 3.2.4. Autorka informuje o tym, że wykorzystwała wzór MDRD do obliczenia wskaźnika przesączania kłębuszkowego. Aby obliczyć GFR konieczne jest

oznaczenie stężenia kreatyniny w surowicy oraz dane o wieku, płci i rasie osoby badanej. Czy to oznacza, że oprócz moczu materiałem badanym wykorzystywanym podczas badań była także surowica? Pozyskiwane były także niektóre dane o pacjentach? Informacje te powinny być umieszczone w pierwszej części rozdziału „Materiał i metody”.

W kolejnym rozdziale Doktorantka szczegółowo przedstawia wyniki swoich badań. Ta część rozprawy zawiera wiele bardzo dobrze opisanych rycin. Niestety nie wszystkie są wyraźne. Podczas opracowywania wyników do publikacji koniecznym będzie uzyskanie lepszej jakości obrazu w przypadku rycin 35, 36, 37, przedstawiających membrany po reakcji z przeciwciałami wykorzystanymi do identyfikacji białek na żelu. Bardzo interesująca jest część opisująca rozdziały elektroforetyczne dla poszczególnych typów białkomoczu, z podziałem białkomoczu kłębuszkowego na stopnie 1, 2 i 3 oraz białkomoczu cewkowego na typy „upper” i „lower”. SDS elektroforeza może być również wykorzystana w diagnostyce gammapatii monoklonalnych związanych z obecnością wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu, do wykrywania innych białek drobnocząsteczkowych, a także do wykrywania obecności białek zanieczyszczających próbkę, takich jak na przykład owoalbumina. Problemy dotyczące jakościowej i ilościowej analizy białek moczu wskazane przez Autorkę w ostatniej części rozdziału „Wyniki” są bardzo ważne dla prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników badań.

Kolejny rozdział – „Dyskusja” dowodzi bardzo dobrej znajomości tematu, znakomitej orientacji w bardzo obszernym piśmiennictwie dotyczącym analizowanych przez Doktorantkę tematów badawczych, a także świadczy o doskonałych zdolnościach analitycznych i interpretacyjnych Autorki.

Przedstawione wnioski stanowią odpowiedź na założone cele. Pani Mgr Mazur stwierdziła, że poliakrylamidowe żele gradientowe umożliwiają rozdział wielu białkowych markerów uszkodzenia nerek i są optymalnym narzędziem do wykrywania przyczyn proteinurii. Czulość analityczna SDS elektroforezy jest wystarczająca do wykrywania białek wskaźnikowych uszkodzenia nerek. SDS elektroforeza umożliwia wizualną ocenę białkomoczu i identyfikację moczy prawidłowych oraz patologicznych. Zastosowana metoda pozwala ponadto na identyfikację frakcji białkowych zawierających markery proteinurii i powiązanie ich z kliniczną klasyfikacją białkomoczu. SDS elektroforeza jest czułą metodą do wstępnej analizy przyczyn proteinurii. Jej zastosowanie umożliwia ukierunkowanie i skrócenie procesu diagnostycznego.

Piśmiennictwo cytowane w rozprawie obejmuje 189 pozycji anglojęzycznych i polskojęzycznych. W znacznej części są to prace z ostatnich 10 lat, ale są to także artykuły z

lat 1951-1999. W pozycji 67 Autorka cytuje stronę: wikipedia.pl, czego nie zaleca się w pracach o charakterze naukowym. Sugeruję aby podczas przygotowywania publikacji zwrócić na te kwestie uwagę.

Rozprawa pani Mgr Pauliny Mazur została poświęcona niezmiernie ważnej tematyce i stanowi samodzielny dorobek naukowy. Uwagi zawarte w niniejszej recenzji w żadnej mierze nie zmniejszają bardzo dużej wartości pracy. Realizacja badań wymagała ogromnego nakładu pracy i wielu umiejętności.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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 z późn. zm.).

Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani Mgr Pauliny Mazur do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie ocenianej dysertacji, która znacznie przekracza przeciętny poziom rozpraw doktorskich z obszaru nauk medycznych i nauk o zdrowiu oraz nauk o kulturze fizycznej. Praca została zrealizowana z wykorzystaniem nowoczesnych metod i narzędzi badawczych, stanowi istotny wkład w rozwój metod diagnostycznych wykorzystywanych we współczesnej medycynie oraz posiada duży potencjał wdrożeniowy.

Z wyrazami szacunku,

Prof. dr hab. Barbara Dołęgowska