

dr hab. Agnieszka Noszczyk-Nowak, prof. UPWr

Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

[agnieszka.noszczyk-nowak@upwr.edu.pl](mailto:agnieszka.noszczyk-nowak@upwr.edu.pl)

---

Ocena rozprawy doktorskiej **lek. wet. Dagmary Winiarczyk**

***„Przydatność proteomiki w rozpoznawaniu nefropatii różnego pochodzenia u psów”***

Z

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

## **Wprowadzenie**

Choroby nerek u psów stanowią poważny problem kliniczny oraz wyzwanie diagnostyczne dla lekarzy weterynarii. Problemem jest wykrycie niewydolności nerek we wczesnym stadium, przed wystąpieniem azotemii, a tym samym przed wystąpieniem objawów klinicznych. Kolejnym wyzwaniem współczesnej nefrologii klinicznej jest określenie stopnia uszkodzenia nefronu, lokalizacji tego uszkodzenia, a na tej podstawie oceny rokowania i oszacowania czasu przeżycia psa z niewydolnością nerek. Na te wyzwania mają odpowiedzieć nowe markery wczesnego uszkodzenia nerek.

Rozprawa doktorska lekarza weterynarii Dagmary Winiarczyk „Przydatność proteomiki w rozpoznawaniu nefropatii różnego pochodzenia u psów”, poświęcona poszukiwaniu markerów wczesnego uszkodzenia nerek oraz ocenie lokalizacji i stopnia uszkodzenia nefronu, a także analizie proteomu moczu stanowi ważny głos w rozważaniach nad markerami wczesnego uszkodzenia nerek. Jest on tym cenniejszy, bo oparty o materiał kliniczny.

## **Omówienie pracy doktorskiej**

Przedstawiona do oceny rozprawa ma typowy układ, liczy 107 stron, zawiera 25 tabel i 9 rycin oraz odnosi się do 134 pozycji piśmiennictwa. W skład rozprawy wchodzi czytelne streszczenie w języku polskim i angielskim. Dysertacja przedstawia analizę efektywności badań proteomicznych u psów zdrowych, dobermanów z rodzinną nefropatią oraz psów z babeszjozą.

We wstępie Doktorantka omawia szczegółowo aktualną diagnostykę niewydolności nerek opartą zarówno o badania laboratoryjne krwi i moczu oraz badania obrazowe. W omówieniu aktualnie stosowanych analiz biochemicznych krwi zabrakło jednak uwzględnienia symetrycznej dimetyloargininy (SDMA). W dalszej części wstępu lek. wet Dagmara Winiarczyk przedstawia proteomikę jako nowe narzędzie, możliwe do wykorzystania w nefrologii oraz metodykę stosowaną w badaniach proteomu moczu. W tej części wstępu Doktorantka z dużą znajomością przedmiotu omawia wspomniane zagadnienia, posiłkując się licznymi danymi literaturowymi. Ostatnią część wstępu stanowi omówienie rodzinnej nefropatii dobermanów oraz nefropatii w przebiegu w przebiegu babeszjozy u psów, czyli docelowych grup badawczych Doktorantki.

Osobiście bardzo cenię konstrukcję rozpraw doktorskich, w której ciężar przesunięty jest w stronę rozbudowanego wprowadzenia, uzasadniającego i prowadzącego w stronę celów badania.

## **Cele pracy**

Doktorantka podjęła się oceny lokalizacji i stopnia uszkodzenia nefronu za pomocą białek o niskiej i wysokiej masie cząsteczkowej oraz analizy proteomu moczu. Cele pracy zostały sprecyzowane jasno, a biorąc pod uwagę niewielką ilość piśmiennictwa z tego zakresu, są one także ambitne i nowatorskie.

## **Materiał i Metody**

W kolejnym rozdziale Autorka omawia materiał oraz metody zastosowane w pracy badawczej. Materiał został dobrany prawidłowo i obejmuje 3 grupy badanych psów: psy zdrowe (12 osobników), doberman z rodzinną nefropatią (10 osobników) oraz psy z babesziosą (10 osobników). Rozdział zawiera ponadto informacje o kryteriach włączenia, jednak nie zawiera kryteriów wyłączenia z badania, co warto uzupełnić przy redagowaniu pracy do druku.

W rozdziale Metodyka następuje opis poszczególnych metod badawczych pracy, uwzględniających ocenę kliniczną, wyniki badań dodatkowych (badania laboratoryjne krwi i moczu, badania w kierunku babesziozy), a także metod będących podstawą do realizacji celu dysertacji czyli oznaczenia stężenia białek o niskiej masie cząsteczkowej (białko wiążące retinol i uromodulina) i wysokiej masie cząsteczkowej (immunoglobulina klasy G) metodą ELISA (brak informacji o tym, czy użyte przeciwciała były gatunkowo-swoiste) oraz analizy proteomu moczu za pomocą elektroforezy 2D w żelu poliakrylamidowym i analizy w spektrometrze mas MALDIT-TOF. Szczegółowe i wyczerpujące przedstawienie metodologii świadczy po raz kolejny o doskonałym przygotowaniu warsztatu badawczego Doktorantki. W badaniach laboratoryjnych zabrakło jednak uwzględnienia oznaczenia SDMA w badanych grupach, a następnie analizy korelacji badanych białek o niskiej masie cząsteczkowej (białko wiążące retinol i uromodulina) i wysokiej masie cząsteczkowej (immunoglobulina klasy G) z tym markerem, który wszedł już do standardu wykrywania wczesnego uszkodzenia nerek.

## **Analiza statystyczna**

Test U Manna-Whitneya został poprawnie użyty w przypadku analizy dwóch grup zmiennych. Do analizy wielu grup zmiennych bardziej odpowiednim testem jest test ANOVA z analizą POST-HOC. Jednoczesne porównywanie większej liczby grup nie może być zastąpione wielokrotnym wykonywaniem testów dla porównania dwóch grup. Przyjęty poziom istotności statystycznej uważam za wystarczający.

## **Zgoda Komisji Etycznej na badania**

W świetle Ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych na prezentowane badania nie jest wymagana zgoda Komisji Etycznej, a jedynie zgoda właścicieli na wykonanie niezbędnych badań diagnostycznych, w tym na pobranie krwi, jednak taka informacja winna się znaleźć w rozdziale Materiał i Metody.

## **Wyniki**

W kolejnym rozdziale Autorka w licznych tabelach, w przejrzysty sposób przedstawiła uzyskane wyniki badań. Tabele są czytelne nawet po wyłączeniu ich z tekstu, a ryciny są bardzo dobrej jakości. W celu wnikliwej i szczegółowej analizy Doktorantka dokonuje oceny badanych parametrów w wyznaczonych grupach badanych zwierząt. Wyniki odnoszą się konsekwentnie do postawionych celów badawczych. Bardzo cenne są wyniki uzyskane od dobermanów z rodzinną nefropatią, będących na różnych etapach zaawansowania choroby. Opisów tej jednostki chorobowej z analizą stężenia białek o niskiej masie cząsteczkowej (białko wiążące retinol i uromodulina) i wysokiej masie cząsteczkowej (immunoglobulina klasy G) w moczu w zależności od zaawansowania choroby nie ma w dostępnej literaturze. Lista białek znajdująca się w prawidłowym moczu oraz moczu psów z babesziosą (tabela 22 i 23) mogą być swoistą monografią i stanowią o unikatowości uzyskanych wyników. W rozdziale tym zabrakło jednak informacji o wieku, płci, masie ciała psów, oraz porównani tych paramentów w badanych grupach.

## **Dyskusja**

W obszernej dyskusji Doktorantka omawia wyniki swoich badań w świetle prac innych autorów. W omówieniu przejrzyste, przekonujące rozumowanie, trafne obserwacje jak i konsekwentny logiczny ciąg wyводу potwierdzają rzetelność i dojrzałość badacza. Zwraca uwagę wyważona i przemyślana interpretacja wyników badań własnych. Nie jest to zadanie łatwe i tak jak w wielu przypadkach, w których udział mają liczne czynniki, nie sposób uzyskać jednoznaczną odpowiedź na postawioną hipotezę badawczą. Widać to wyraźnie w części omówienia dotyczącego korelacji szlaków metabolicznych, biorących udział w odpowiedzi zapalnej, z białkami zidentyfikowanymi przez Doktorantkę w moczu psów z babesziosą. Dzieje się tak również, gdy wyników badań własnych nie można odnieść bezpośrednio do badań innych autorów, ze względu na różnice metod badawczych, badanego materiału lub po prostu brak odpowiednich prac w literaturze, jak w przypadku analizy proteomu moczu psów z babesziosą.

Analiza ograniczeń metodologicznych i technicznych pracy, zawarta w całej dyskusji wyników, jednak jako osobny podrozdział stanowiłaby cenne uzupełnienie dysertacji.

## **Wnioski**

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka wyciągnęła prawidłowo sformułowane wnioski, oparte na uzyskanych wynikach. Niektóre z nich, biorąc pod uwagę wspomniany niedobór literatury tematu wyznaczać będą kierunki dalszych badań w tym zakresie.

## **Piśmiennictwo**

Piśmiennictwo pracy ma typowy układ, jest współczesne, prawidłowo dobrane i bardzo liczne, w przeważającym stopniu anglojęzyczne. Doktorantka wykorzystuje również prace polskich badaczy.

Jak każda praca, również przedstawiona do recenzji dysertacja nie ustrzegła się przed pojedynczymi pomyłkami oraz drobnostkami literowymi, nie wpływającymi na jej wartość naukową.

## **Uwagi redakcyjne**

Brak wykazu skrótów, znacznie utrudnia poruszanie się po tekście.

Brak pełnych nazw badanych parametrów biochemicznych w rozdziale Metody (str. 19).

Słowo „obrobione bioinformatycznie” należałoby zastąpić „poddano analizie” (str. 22).

W tabeli 9 zabrakło jednostek dla parametrów biochemicznych krwi.

Str. 30 Akapit 2, wers 2, Doktorantka pisze określenia „...wartości trzech markerów były istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej”. W zdaniu tym brakuje określenia co było istotne statystycznie – mniemam, że różnica lub wartości były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej.

Na tej samej stronie brak jest jednostek w odniesieniu do stężenia (a nie poziomu) uRBP/uCrea, uTHP/uCrea (takie jednostki widnieją w tabeli 11).

Pierwsze akapity podrozdziału 4.2 winny się znaleźć w rozdziale Metody.

W tabeli 10 nie zaznaczono różnic istotnych statystycznie po między badanymi grupami.

W tabeli 11 umieszczony w taki sposób symbol \*wskazuje na obecność różnic istotnych statystycznie jedynie po między grupą psów z babesziosą i grupą dobermanów z rodzinną nefropatią (uRBP/uCREA i

uIgG/uCREA). Trudno też stwierdzić które grupy różnią się istotnie statystycznie po między sobą w zakresie stężenia uTHP/uCrea.

Wielokrotnie używane słowo „poziom” należy zastąpić słowem „stężenie”, gdyż takie jednostki widnieją przy opisywanych przez Doktorantkę parametrach.

## **Podsumowanie**

W podsumowaniu opinii wysoko oceniam przygotowanie teoretyczne Doktorantki, umiejętność postawienia problemu badawczego i jego realizacji. Sposób przeprowadzenia badań, różnorodność analizowanych parametrów, przedstawienie wyników i ich interpretacja dowodzi nie tylko dobrej znajomości przedmiotu badań, ale także dużej dojrzałości Doktorantki jak adepta pracy naukowej. Przedstawiona dysertacja stanowi na pewno dobry krok w kierunku poszerzenia panelu diagnostycznego niewydolności nerek u psów na jej wczesnym etapie.

Rozprawa doktorska lekarz weterynarii Dagmary Winiarczyk „Przydatność proteomiki w rozpoznawaniu nefropatii różnego pochodzenia u psów” spełnia w mojej ocenie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk weterynaryjnych, a określone w art. 13 ust. 1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 64, poz. 595, ze zm.). Na tej podstawie przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Wrocław. 2.11.2017



Dr hab. Agnieszka Noszczyk-Nowak, prof. UPWr