

Zabrze 29.06.2019r.

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz Anny Malinowskiej
pt. „Analiza stężeń wybranych interleukin pro i przeciwzapalnych oraz
adipomiokiny iryzyny w surowicy krwi u dzieci w wieku przedpokwitaniowym
z somatotropinową niedoczynnością przysadki przed- i w trakcie leczenia hormonem
wzrostu”

Od dawna wiadomo, że tkanka tłuszczowa pełni funkcję rezerwuaru energetycznego organizmu, co wynika ze zdolności do gromadzenia dużych zapasów energii, która jest wydatkowana w razie potrzeby, stanowiąc ważny bufor wahań energetycznych organizmu. Pełni także funkcję izolatora termicznego w związku z obszernym rozmieszczeniem jej w obrębie skóry i podskórnie, umożliwiając utrzymywanie prawidłowej temperatury ciała. Tak więc przez wiele lat tradycyjne spojrzenie na tkankę tłuszczową ograniczało jej funkcję do pasywnego rezerwuaru zapasów energetycznych o niedużym znaczeniu klinicznym.

Postęp badań eksperymentalnych i klinicznych nad tkanką tłuszczową pozwolił na potwierdzenie wysuwanej wcześniej tezy, że tkanka tłuszczowa jest wysoko aktywnym metabolicznie organem wydzielania wewnętrznego. Jest miejscem ekspresji i sekrecji licznych bioaktywnych peptydów, zwanych adipokinami, które wykazują działanie zarówno lokalne (autokrynne/parakrynne), jak i systemowe (endokrynne).

Jest też miejscem metabolizmu hormonów steroidowych i hormonów tarczycy. W tkance tłuszczowej są rozmieszczone receptory układu adrenergicznego oraz receptory dla hormonów tarczycy, glikokortykosteroidów, androgenów, estrogenów, cytokin (np. TNF- α , IL-6), lipoprotein, czynników wzrostowych. Ten wyraźny związek tkanki tłuszczowej z hormonami i cytokinami wskazuje na możliwość ich wzajemnych relacji oraz współdziałania w mechanizmach homeostazy energetycznej, metabolicznej i immunologicznej ustroju.

Somatotropinowa niedoczynność przysadki (SNP) to stan wywołany zaburzeniami syntezy lub sekrecji hormonu wzrostu (GH) przez komórki somatotropowe przysadki. Istotnym objawem SNP, oprócz niskiego wzrostu jest zaburzony skład ciała. U chorych z SNP obserwuje się przewagę tkanki tłuszczowej w stosunku do beztłuszczowej masy ciała. Tkanka tłuszczowa jest nadmiernie rozwinięta, a jej rozmieszczenie wskazuje na otyłość

centralną z przewagą tłuszczu trzewnego. Obniżona masa tkanki mięśniowej prowadzi do osłabienia siły mięśniowej. Nieprawidłowy skład ciała od okresu przedpokwitaniowego może prowadzić u chorych z niedoborem hormonu wzrostu do zwiększenia ryzyka rozwoju zespołu metabolicznego, dyslipidemii, insulinooporności, upośledzenia czynności śródbłonka naczyniowego. Zatem substytucyjne leczenie hormonem wzrostu u osób wykazujących deficyt tego hormonu nie tylko znamienne promuje wzrost, ale także wywiera dobroczynny wpływ na metabolizm.

Mechanizmy patogenetyczne i wzajemne powiązania pomiędzy hormonem wzrostu a hormonami tkanki tłuszczowej wywierającymi wpływ na procesy metaboliczne organizmu nie są jeszcze dokładnie poznane, pozostając nadal w sferze badań.

W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć tylko nieliczne doniesienia na temat oceny wzajemnych powiązań pomiędzy stężeniem we krwi GH a adipocytokinami, w tym interleukinami pro- i przeciwzapalnymi oraz miokinami, np. iryzyną.

Brakuje też badań dotyczących oceny zależności pomiędzy stężeniem GH a stężeniem tych adipocytokin we krwi u dzieci z somatotropinową niedoczynnością przysadki, leczonych hormonem wzrostu.

Dlatego też z uznaniem należy przyjąć wybór tematu rozprawy doktorskiej, w której lekarz Anna Malinowska podjęła próbę oceny stężeń hormonu wzrostu i w/w cytokin oraz iryzyny w surowicy krwi u dzieci niskorosłych, leczonych hormonem wzrostu.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa, licząca 180 stron maszynopisu, składa się z rozdziałów typowych dla tego rodzaju prac.

We wstępie doktorantka omawia zagadnienia dotyczące struktury i funkcji hormonu wzrostu oraz jego receptorów. Przedstawia objawy kliniczne niedoboru GH, w tym zaburzenia składu ciała towarzyszące deficytowi tego hormonu, a także omawia metody leczenia hormonem wzrostu u dzieci w przeszłości i aktualnie. Opisuje cele leczenia preparatami hormonu wzrostu oraz omawia aspekty insulinooporności, jakie mogą towarzyszyć terapii.

Następnie przedstawia zagadnienia dotyczące tkanki tłuszczowej u człowieka, omawiając najistotniejsze jej funkcje z podziałem na poszczególne rodzaje tkanki tłuszczowej, tj. tkankę tłuszczową białą (WAT), brunatną (BAT) i tzw. beżową. W tym podrozdziale doktorantka prezentuje najnowsze dane literaturowe na ten temat.

Dalej we wstępie omawia najpierw ogólnie cytokiny, a następnie w sposób szczegółowy poszczególne cytokiny, w tym czynnik martwicy nowotworu TNF- α , interleukinę -1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 oraz adipomiokinę - iryzynę. Są to cytokiny, które

doktorantka badała i wyniki przedstawiła w swojej pracy u dzieci niskorosłych. Doktorantka zwróciła uwagę na to, że w dostępnym piśmiennictwie prace na temat są nieliczne, a publikowane dotychczas wyniki niejednoznaczne.

Doktorantka założyła, że wyniki przeprowadzonych badań pozwolą stwierdzić czy niedobór GH oraz leczenie hormonem wzrostu dzieci z SNP w okresie przedpowitaniowym może wpływać na stężenie w surowicy interleukin: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α i iryzyny, a także czy stężenia tych interleukin we krwi mogą się okazać markerem metabolicznego lub immunologicznego działania tego hormonu.

Dlatego doktorantka wyznaczyła sobie następujące szczegółowe cele pracy:

- Ocena stężenia interleukin: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α oraz iryzyny w surowicy u dzieci w wieku przedpokwitaniowym z SNP rozpoznaną zgodnie z kryteriami Programu Lekowego NFZ przed rozpoczęciem i po 6 miesiącach terapii ludzkim rekombinowanym hormonem wzrostu.
- Ocena związku stężenia interleukin: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α i iryzyny z obserwowaną w wyniku leczenia poprawą szybkości wzrastania, zmianą składu masy ciała i wybranymi parametrami antropometrycznymi oraz gospodarki węglowodanowej i lipidowej.
- Badanie wpływu leczenia hormonem wzrostu na gospodarkę węglowodanową i lipidową i związek tych zmian ze zmianami stężenia interleukin, TNF- α i iryzyny.
- Ocena otrzymanych wyników pod względem ich potencjalnej wartości diagnostycznej i prognostycznej w leczeniu dzieci z SNP hormonem wzrostu.

Założenia i cele pracy uważam za zasadne. Do badań wybrano grupę dzieci niskorosłych, z somatotropinową niedoczynnością przysadki, przed i po 6 miesięcznym leczeniu GH oraz grupę kontrolną dzieci zdrowych z prawidłowym wzrostem.

Badaniami objęto 55 dzieci niskorosłych, w tym 30 dzieci z postacią idiopatyczną somatotropinowej niedoczynności przysadki zakwalifikowanych do leczenia hormonem wzrostu zgodnie z kryteriami Programu Lekowego oraz 25 dzieci zdrowych bez niskorosłości, które zrekrutowano do badań spośród dzieci zgłaszających się do Poradni Endokrynologicznej IPCZD w Warszawie, u których wykluczono zaburzenia hormonalne.

Badanie miało charakter porównawczy i prospektywny. Liczebność grup z punktu widzenia statystycznego była wystarczająca. Grupę pacjentów z SNP oraz grupę kontrolną dobrano odpowiednio pod względem wieku, stadium pokwitania, masy ciała oraz wzrostu.

U dzieci z SNP badania zostały przeprowadzone zarówno przed-, jak i po wdrożeniu sześciomiesięcznej kuracji hormonem wzrostu. Tak zaplanowane badanie prospektywne wydaje się niezwykle cenne.

U wszystkich badanych doktorantka przeprowadziła badanie podmiotowe i przedmiotowe z uwzględnieniem pomiarów antropometrycznych, w tym pomiaru składu ciała a w grupie badanej (z SNP) dodatkowo wykonała dwukrotnie analizę składu ciała przed rozpoczęciem leczenia i po pół rocznej kuracji GH, stosując oprócz metody antropometrycznej metodę bioimpedancji.

W rozdziale „Metody” doktorantka szczegółowo opisuje metodykę badań nie tylko składu ciała, ale i metodykę przeprowadzonych analiz biochemicznych i hormonalnych, a także przedstawia metody oceniające wskaźniki insulinooporności i insulinowrażliwości. Precyzyjnie opisuje interpretację wyników tych badań.

Doktorantka zastosowała prawidłowo dobrane metody analizy statystycznej.

Przedstawiając na stronach 50- 89 obszerne wyniki swoich badań doktorantka dodatkowo dokonała podsumowania i usystematyzowania uzyskanych wyników, co wydaje się szczególnie cenne, zwłaszcza w obliczu tak wielu badanych parametrów. To ułatwia recenzentowi zapamiętanie najistotniejszych wyników, które wymagają omówienia.

W przeprowadzonych badaniach doktorantka wykazała m.in., że nie było istotnych różnic w stężeniu badanych interleukin, TNF- α oraz iryzyny w grupie SNP przed leczeniem ani po 6 miesiącach leczenia rhGH w porównaniu do wyników w grupie kontrolnej. Po 6 miesiącach leczenia rhGH stężenie TNF- α istotnie wzrosło w porównaniu do stężenia w grupie SNP przed leczeniem. Stwierdzono, że po 6 miesiącach terapii rhGH stężenie IL-1 β , IL-6, IL-10 było wyższe, stężenie IL-2 oraz IL-4 było niższe, a stężenie iryzyny takie samo w porównaniu do wyników przed rozpoczęciem leczenia; różnice te były nieistotne statystycznie.

Doktorantka wykazała, że po 6 miesiącach leczenia hormonem wzrostu istotnie zmniejszył się niedobór wzrostu wyrażony w SDS wysokości ciała, zwiększył się odsetek beztłuszczowej i zmniejszył się odsetek tłuszczowej masy ciała, co nie jest żadnym zaskoczeniem w świetle wcześniejszych badań, które stały się podstawą do wdrażania terapii GH u dzieci z SNP. Dlatego według mnie jako recenzenta, doktorantka nie musiała tych obserwacji prezentować w podsumowaniu wyników.

W dalszej części podsumowania wyników doktorantka wskazuje na istotnie ujemne lub dodatnie zależności pomiędzy poszczególnymi badanymi parametrami, tj. stężeniami interleukin, TNF- α oraz iryzyny we krwi a parametrami antropometrycznymi, parametrami gospodarki węglowodanowej i lipidowej u dzieci a SNP przed- i po leczeniu GH.

Charakterystykę badanych grup dzieci oraz wyniki badań doktorantka przedstawiła w 19 czytelnym tabelach i na 19 rycinach, które zamieściła w tekście pracy.

W dyskusji, zawierającej 40 stron maszynopisu, w tym 9 podrozdziałów doktorantka konfrontuje uzyskane wyniki z wynikami innych autorów. Po kolei omawia poszczególne wyniki własnych badań, odnosząc się do dotychczasowych danych literaturowych. Krytycznie prowadzona dyskusja świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym doktorantki i znajomości piśmiennictwa.

W rozprawie doktorantka zamieściła aż 306 pozycji piśmiennictwa, w tym polskiego i anglojęzycznego. Piśmiennictwo jest prawidłowo dobrane i aktualne.

W oparciu o uzyskane wyniki doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. Nie wykazano istotnych różnic w stężeniu w surowicy badanych cytokin: TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 oraz iryzyny między grupą SNP przed rozpoczęciem leczenia a grupą kontrolną. Stwierdzono istotnie wyższe stężenie iryzyny i IL-1 β u dzieci z większym niedoborem wysokości ciała w grupie SNP przed leczeniem rhGH.
2. Leczenie rhGH przez okres 6 miesięcy nie wpłynęło istotnie na stężenie badanych interleukin przeciwzapalnych (IL-4, IL-10) i prozapalnych (IL-1 β , IL-2, IL-6), natomiast spowodowało istotny wzrost stężenia TNF- α .
3. Przyrost stężenia (Δ) TNF- α w trakcie leczenia rhGH korelował dodatnio z odsetkiem tłuszczowej masy ciała a ujemnie z odsetkiem tłuszczowej masy ciała.
4. Stężenie w surowicy badanych cytokin pro- i przeciwzapalnych nie wydaje się być użytecznym biomarkerem do monitorowania wpływu leczenia hormonem wzrostu, jednak wyższe stężenie IL-2 i IL-4 przed leczeniem korelowało dodatnio z przyrostem stężenia (Δ) IGF-1 po 3 miesiącach terapii rhGH.
5. Niedobór GH oraz 6-miesięczne leczenie rhGH nie wpłynęło na stężenie iryzyny u dzieci z SNP w wieku przedpokwitaniowym, natomiast przyrost stężenia (Δ) iryzyny korelował dodatnio z przyrostem tłuszczowej masy ciała.
6. Nie zaobserwowano istotnego wpływu leczenia rhGH i stężenia badanych cytokin na parametry gospodarki węglowodanowej i tłuszczowej. Jedynie przyrost stężenia (Δ)

iryzyny korelował ujemnie z przyrostem (Δ) glikemii na czczo oraz dodatnio z przyrostem stężenia (Δ) frakcji HDL cholesterolu.

Korzystając z przywileju i obowiązku recenzenta pragnę podkreślić, że praca jest bardzo interesująca, napisana nie tylko bardzo dobrze pod względem merytorycznym, ale też niezwykle starannie. Z przyjemnością się ją czyta.

Jedynym drobnym niedociągnięciem, na który pragnę zwrócić uwagę, a którego można by uniknąć przy przygotowaniu pracy do druku jest sformułowanie trzeciego celu pracy, cyt. „badanie wpływu leczenia hormonem wzrostu na...”. Uważam, że cel ten jest sformułowany niezręcznie, bo jest zbyt daleko sięgający. Można by ten cel oczywiście osiągnąć, ale za pomocą przeprowadzenia badań randomizowanych z podwójną ślepą próbą. Inaczej nie da się oceniać wpływu terapii jakimś lekiem na cokolwiek.

Przyjęło się, że wnioski powinny stanowić odpowiedź na cele badań. Według recenzenta nie musi być ich tak dużo i nie muszą być zbyt rozbudowane, bo niektóre z nich są wyłącznie powtórzeniem wyników. Dlatego trzeba by było je przeformułować i skrócić przed przygotowaniem pracy do druku.

W moim przekonaniu doktorantka wykonała niezwykle żmudne i pracochłonne zadanie, zadając sobie trud oceny aż tak dużej liczby interleukin. Wymagało to od niej zaznajomienia się z bardzo bogatym piśmiennictwem oraz znacznym poszerzeniem wiedzy w tym zakresie, co znalazło wyraz w obszernym i dobrze napisanym wstępie, omówieniu i prowadzonej przez nią dyskusji.

W moim przekonaniu praca lekarz Anny Malinowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, co w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Pragnę także podkreślić, że zasługuje na wyróżnienie.

Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie o dopuszczenie lekarz Anny Malinowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Serdecznie dziękuję za przywilej recenzowania tej pracy.

Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Ziora