

RECENZJA PRACY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH
magister Renaty Grzywa-Czuba

pt. „*Profil ekspresji insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), receptora IGF-1(IGF-1R) oraz wybranych receptorów naturalnego układu odporności (NOD1, NOD2, NLRP3, IPAF) w leukocytach i osoczu krwi obwodowej u dzieci z nadciśnieniem tętniczym pierwotnym (NTP).*”

wykonanej pod kierunkiem
prof. dr hab.n. med. Jacka Michałkiewicza

oraz

dr n. biol. Joanny Trojanek
w Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej
Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”

Pierwotne nadciśnienie tętnicze jedną z głównych chorób układu sercowo-naczyniowego, ze względu na rozpowszechnienie i znaczenie dla zdrowia populacji jest uważane za kluczową chorobę cywilizacyjną. Magister Renata Grzywa-Czuba podjęła ważki poznawczo i klinicznie temat roli przewlekłego stanu zapalnego w patomechanizmie pierwotnego nadciśnienia tętniczego (NTP), a także procesów wpływających na ryzyko istotnych powikłań narządowych, przede wszystkim w zakresie mięśnia sercowego i naczyń tętnicznych. Doktorantka skupiła się na ocenie regulacyjnej funkcji insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), jego receptora (IGF-1R) oraz NOD-podobnych receptorów (NLRs) postulując ich wiodącą rolę w etiopatogenezie NTP u dzieci. Autorka słusznie wskazała na potencjalnie mniejszy wpływ czynników środowiskowych w populacji pediatrycznej niż u dorosłych.

Doktorantka zaplanowała wykonanie przekrojowych analiz porównawczych w oparciu o badania wykonane na poziomie genów, białek oraz komórek.

Praca doktorska ma układ klasyczny, składa się ze 109 stron tekstu wraz z piśmiennictwem. We *Wstępie* Doktorantka przedstawiła stan aktualnej wiedzy na temat epidemiologii, czynników ryzyka i obrazu klinicznego, pierwotnego i wtórnego nadciśnienia tętniczego u dzieci. Przytoczyła również przesłanki wskazujące na udział przewlekłej

odpowiedzi zapalnej w patomechanizmie NTP. Doktorantka skupiła się przede wszystkim na podmiocie planowanych badań, a więc białku IGF-1 i jego receptorze, oraz receptorach NOD-podobnych, szczegółowo omawiając aktualny stan wiedzy na temat biologii tych białek, ich fizjologicznych funkcji regulatorowych oraz postulowanej roli w NTP. Przedstawiła dane wynikające zarówno z badań *in vitro*, prac doświadczalnych na modelach zwierzęcych, jak i u ludzi. Ta część Wstępu potwierdza dobrą znajomość omawianych zagadnień, dostępnej literatury, Autorka wielokrotnie celnie wskazuje niedostatki w istniejącej wiedzy. W moim odczuciu zabrakło jednak klarownej analizy danych dla populacji pediatrycznej, lub też wskazania ich braku w konkretnych zakresach tematycznych.

Pozostała część Wstępu prezentująca udział układu immunologicznego w patogenezie NTP wydaje się nadmiernie uproszczona, wręcz ogólnikowa. Należy również wytknąć szereg rażących błędów w stosowanej terminologii („nadciśnienie krwi”, „obniżone nadciśnienie tętnicze krwi”), a także liczne niezgrabności stylistyczne, które nie powinny mieć miejsca w pracy naukowej.

Autorka sformułowała pięć Celów głównych pracy, w szczególności zaplanowała określenie :

1. profilu ekspresji genów: insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (*IGF-1*), jego receptora (*IGF-1R*) oraz wybranych receptorów naturalnego układu odporności (*NOD1*, *NOD2*, *NLRP3* i *IPAF*) w leukocytach krwi obwodowej na poziomie mRNA;
2. stężenia IGF-1 w osoczu
3. ekspresji receptora CD221 (*IGF-1R*) w subpopulacjach leukocytów krwi obwodowej;
4. dystrybucji regulatorowych limfocytów T i B we krwi obwodowej

oraz szczegółowe cele badawcze, w tym ustalenie

- czy u dzieci z NTP zachodzą zmiany w zakresie stężenia IGF-1 w osoczu oraz ekspresji *IGF-1* i jego receptora (*IGF-1R*) na poziomie mRNA w leukocytach krwi obwodowej,
- czy ewentualne zmiany profilu ekspresji *IGF-1*, *IGF-1R* w leukocytach mają związek z poziomem ekspresji receptorów: *NOD1*, *NOD2*, *NLRP3* oraz *IPAF* w tych komórkach,
- czy profil ekspresji badanych receptorów koreluje z poziomem ekspresji cytokin prozapalnych (*IL-1 β* , *IL-6*, *IL-18*) i przeciwzapalnych (*TGF- β*) indukowanych w leukocytach,
- czy profil ekspresji badanych receptorów, insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (*IGF-1*) oraz badanych parametrów zapalnych, tj. cytokin istotnie koreluje z dystrybucją

limfocytów T- i B-regulatorowych we krwi obwodowej, z ekspresją receptora IGF-1 (CD221) na leukocytach oraz parametrami klinicznymi w NTP,

- które spośród badanych czynników mają wpływ na parametry kliniczne, szczególnie sercowo-naczyniowe w NTP

Doktorantka podjęła również wyzwanie jakim była próba oceny znaczenia tych czynników w kontekście parametrów biochemicznych i klinicznych w grupie dzieci z NTP oraz grupie kontrolnej dzieci z normotensją.

W rozdziale *Materiał i metody* Autorka omówiła metodologię pracy badawczej.

Przedstawiono strategię rekrutacji uczestników we współpracy z Kliniką Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego IP-CZD oraz przyjęte kryteria wykluczenia z badania, w opisie nie uwzględniono natomiast kryteriów włączenia. Niewątpliwie były one elementem protokołu badawczego, praca została bowiem zaakceptowana przez Komisję Bioetyczną IP-CZD (nr zgody 44/KBE/2016).

Rozdział zawiera szczegółowe omówienie metodologii, zwłaszcza części analitycznej, w tym technik molekularnych (real-time PCR) wykorzystanych do oceny ekspresji mRNA genów *NOD1*, *NOD2*, *NLRP3*, *IPAF*, *RIPK2*, *ASC*, *IGF-1*, *IGF-1R*, *TGF-β*, *IL-6*, *IL-18*, *IL-1β*, *kaspazy 1* oraz *G3PDH*, a także immunologicznych, w tym metody ELISA zastosowanej dla oceny stężenia białka IGF-1 oraz metodę cytometrii przepływowej, którą Autorka posłużyła się do oceny obwodowej dystrybucji Tregs oraz Bregs oraz ekspresji IGFR-1R w leukocytach krwi obwodowej.

Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem prawidłowo dobranych metod.

Autorka uzyskała interesujące z poznawczego punktu widzenia wyniki, które w sposób logiczny i wyczerpujący przedstawiła w 8 tabelach i na 8 wykresach.

Do badania włączono grupę 39 pacjentów z NTP (29 chłopców, 10 dziewcząt) i 35 osób zdrowych (19 chłopców, 16 dziewcząt). Analiza danych antropometrycznych oraz klinicznych wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami, przede wszystkim w zakresie BMI oraz parametrów charakteryzujących czynnościowo mięsień sercowy serce (wskaźnik masy lewej komory) i duże naczynia tętnicze, aortę oraz tętnice szyjne (w tym strukturę ich ściany oraz prędkość fali tętna).

Analizy statusu molekularnego w zakresie zaplanowanych badań wykazały istotnie znamienne statystycznie niższą ekspresję genu receptora *IGF-1R* ($p=0,0.0017$), ale nie genu

kodującego białko *IGF-1* ($p=0,92$), a w zakresie genów receptorów naturalnego układu odporności istotnie obniżoną ekspresję *NOD1*, *NOD2*, *NLRP3*, *IPAF*, *RIPK2* oraz *TGF- β* , a także istotnie wyższą ekspresję *IL-1 β* . Autorka nie zaobserwowała różnic w zakresie ekspresji genów *IL-18*, *IL-6*, oraz *kaspazy 1*.

Analiza stężenia produktu białkowego genu *IGF-1* również nie wykazała różnic, w obu badanych grupach stężenia pozostały w granicach referencyjnych. Ze względu na niską liczebność badanych grup nie wykonano analizy podgrup.

Ocena immunofenotypu populacji komórkowych we krwi obwodowej potwierdziła obecność istotnych różnic pomiędzy grupą dzieci z NTP i grupą kontrolną w zakresie niższego odsetka limfocytów *IGF-1⁺* (*CD221⁺*) ($p=0,02$) oraz monocytów *IGF-1⁺* ($p=0,0003$), jak również gęstości tego receptora na monocytach ($p=0,022$), ale nie limfocytach ($p=0,15$). Neutrofile nie wykazywały istotnych różnic w ekspresji receptora dla *IGF-1*.

W ostatniej części pracy Doktorantka zgodnie z założonymi celami wykonała analizę korelacji w zakresie ekspresji genu *IGF-1* z parametrami klinicznymi. Wykazała ujemną zależność wobec skurczowego ciśnienia tętniczego, prędkości fali tętna (PWV) oraz grubości kompleksu błona wewnętrzna – błona środkowa tętnic szyjnych wspólnych (IMTR), silną dodatnią zależność z ekspresją genów kodujących mediatory odpowiedzi zapalnej, w szczególności z ekspresją *RIPK2* na szlaku sygnalizacyjnym receptorów *NOD1* i *NOD2* oraz z *IL-6*, a także z odsetkiem *GARP⁺* oraz *LAP⁺* limfocytów Treg oraz z odsetkiem monocytów *CD221⁺* i gęstością receptora *CD221* (MFI) na limfocytach krwi obwodowej. W zakresie korelacji ekspresji genu *IGF-1R*, wykazała ujemny związek z wartościami skurczowego ciśnienia tętniczego i prędkością fali tętna, silnie dodatnią zależność z ekspresją genów kodujących receptory *NOD1*, *NOD2*, kinazę *RIPK2* oraz *IL-6* i *TGF- β* . Ponadto zaobserwowała szereg innych zależności, z których za najistotniejsze z punktu widzenia poznawczego należy uznać ujemną korelację ekspresji genu *NOD1* z PWV oraz genu *NOD2* z ciśnieniem tętniczym skurczowym krwi, a także odsetka limfocytów Treg *LAP⁺* z wartością IMTR oraz odsetka Treg *GARP⁺* ze względną grubością ściany lewej komory serca.

Pracę podsumowuje *Dyskusja* w której Doktorantka zmierzyła się ze skąpą lub bardzo skąpą wiedzą literaturową w zakresie badanych zagadnień NTP u dzieci. Konieczne były odniesienia do danych pochodzących od dorosłych, a nawet do badań doświadczalnych na modelu mysim. Dyskusje oparto na dobrze dobranym piśmiennictwie liczącym 158 publikacji. Jedynie 31 z nich pochodzi z lat 2018-2022.

W tej części pracy Doktorantka analizowała wyniki własne w kontekście wyników innych autorów, a w szczególności umiejętnie podkreśliła wartość poznawczą swojej pracy. Przemysłana struktura sprzyjała szczegółowemu odniesieniu się do najważniejszych wyników, zarówno w kontekście mechanizmów kształtujących odpowiedź immunologiczną, jak również ich potencjalnej roli biologicznej i klinicznej. Mgr Grzywa -Czuba odniosła się również krytycznie do słabych stron swojego projektu i pracy, słusznie wskazując na utrudnione wnioskowanie spowodowane niską liczebnością i niską reprezentatywnością (wiek, wzrost) badanej grupy, podkreśliła również brak dopasowania obu grup pod względem parametrów antropomorficznych, wieku, ekspozycji środowiskowej, chorób współistniejących i ewentualnego wpływu farmakoterapii. Pełna ocena roli czynników ryzyka jest utrudniona, gdyż jak wspomniano w rozdziale Metody nie opisano kryteriów włączenia do badania.

Pomimo czytelnej struktury Dyskusji, rozdział ten w wielu fragmentach sprawia nieco chaotyczne wrażenie. Autorka nie ustrzegła się też od kilku istotnych błędów. W Dyskusji wielokrotnie nieprawidłowo używa pojęć „czynnik prognostyczny”, „czynnik protekcyjny” czy też „czynnik predykcyjny”. Powołuje się zwłaszcza na znamienne statystycznie wyniki przeprowadzonej analizy regresji, tymczasem wykazanie znamiennej korelacji nie daje podstaw do wysnuwania wspomnianych twierdzeń i definiowania statusy, czy też wartości biomarkera. Przykładem jest postulowana przez Doktorantkę „predykcyjna wartość” stężenia IGF-1 względem zmian parametrów ciśnienia tętniczego. Biomarker predykcyjny, jak wiadomo, określa prawdopodobieństwo pozytywnej odpowiedzi na specyficzny typ terapii. Tego typu analiz Doktorantka nie prowadziła, również protokół realizowanych badań nie został zaplanowany pod kątem ewentualnego klinicznego wartościowania biomarkerów na diagnostyczne, prognostyczne i predykcyjne (brak grup badawczej i walidacyjnej; niska liczebność analizowanych grup; nie zaplanowano oceny efektywności terapii, czy też wpływu na rokowanie).

W oparciu o przedstawione wyniki Doktorantka sformułowała 7 wniosków. Część z nich odnosi się do Celów pracy bezpośrednio (#2, #4, #5) i odpowiada wprost na postawione pytania/hipotezy badawcze. Pozostałe zawierają postulaty, bądź też daleko posunięte stwierdzenia, które tylko częściowo można uzasadnić w oparciu o przedstawione wyniki. W szczególności należałoby z większą ostrożnością formułować konkluzje wskazujące na odmienny charakter stanu zapalnego w NTP u dzieci i dorosłych – ze względu na wymienione przez Doktorantkę ograniczenia, niską reprezentatywność i liczebność grupy badanej.

Podobnie punkt #6 nie ma, i słusznie, charakteru stwierdzenia popartego danymi, jest bardziej sugestią/propozycją dalszego kierunku badań.

Reasumując, praca doktorska magister Renaty Grzywa-Czuba podejmuje istotny problem poznawczy, zagadnienia badawcze mają charakter nowatorski. Doktorantka prawidłowo sformułowała cele, jak również trafnie dobrała narzędzia badawcze. Wyniki przedstawiła w klarowny sposób. Praca zawiera również słabsze strony wymienione powyżej w treści recenzji, zwłaszcza w zakresie przeprowadzonej dyskusji wyników i wnioskowania. Istotnym niedociągnięciem jest brak opisu kryteriów włączenia pacjentów/ochotników do badania. Mam również zastrzeżenia językowe i stylistyczne do tekstu pracy, co konstataję z prawdziwą przykrością.

Finalnie moja ocena przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jest jednak pozytywna, uważam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora nauk medycznych.

Wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 10. listopada 2022 r.

KIEROWNIK
Zakładu Genetyki i Immunologii Klinicznej
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc
Prof. dr hab. n. med.
Joanna Chorostowska-Wynimko

INSTYTUT GRUŹLICY I CHOROBY PŁUC
Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej
01-138 Warszawa, ul. Płocka 26
tel. (22) 43-12-158, (22) 43-12-105
fax (22) 43-12-358
e-mail: immuno@igichp.edu.pl