

Prof. dr hab. med. Urszula Demkow

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieków Rozwojowych

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr 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)."

Praca doktorska dotyczy bardzo aktualnych i ważnych zjawisk – nadciśnienia tętniczego, zaburzeń metabolicznych u dzieci oraz zależności pomiędzy fenotypem klinicznym a układem odpornościowym.

Nadciśnienie tętnicze oraz zaburzenia metaboliczne są istotnym problemem współczesnej cywilizacji. Badania ostatnich lat zwracają również uwagę na powiązanie pomiędzy układem sercowo-naczyniowym a układem odpornościowym. Jednym z istotnych czynników biorących udział w patogenezie nadciśnienia uważa się IGF-1, który moduluje śródbłonkową syntezę tlenku azotu, kluczowego wazodylatora. Szeroki zakres działania IGF-1 jest związany z powszechnym występowaniem receptora tego czynnika w różnych komórkach i narządach organizmu. Patogeneza nadciśnienia i jego powikłania są powszechnie znane, szczególnie zainteresowanie natomiast budzi rola IGF-1 w patogenezie zaburzeń układu krążenia. W piśmiennictwie podkreśla się również udział receptorów NOD-podobnych (NLRs), odpowiadających na czynniki hormonalne i metaboliczne biorące udział w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Wybrany temat pracy doktorskiej ma zatem istotne implikacje merytoryczne i praktyczne.

Przedstawiona praca ma typowy układ rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Starannie przygotowany maszynopis pracy liczy 109 stron, jest podzielony na 12 rozdziałów, opatrzony jest 8 czytelnymi rycinami, oraz 13 tabelami i zawiera zestawienie 158 pozycji piśmiennictwa.

Cele pracy są jasne i dobrze uzasadnione. Celem przedłożonej rozprawy doktorskiej była analiza powiązań pomiędzy profilem ekspresji IGF-1, NOD1, NOD2, NRLP3 i IPAF w leukocytach krwi obwodowej, stężenia IGF-1 w osoczu i moczu, ekspresji receptora IGF-1R w subpopulacjach komórek krwi obwodowej, dystrybucji limfocytów TREG i BREG oraz ocena zaburzeń parametrów biochemicznych i objawów klinicznych u dzieci z samoistnym nadciśnieniem tętniczym w porównaniu grupy dzieci normotensyjnych.

We wstępie Doktorantka przedstawiła informacje o patogenezie nadciśnienia tętniczego w populacji pediatrycznej. Ważnym zjawiskiem epidemiologicznym, które Doktorantka podkreśla, jest wzrost zapadalności na choroby sercowo-naczyniowe powiązane z zaburzeniami metabolicznymi i otyłością w populacji dzieci. Alarmującym zjawiskiem jest wzrost odsetka dzieci z NT do około 10%. Autorka wspomina również o genezie wtórnych przyczyn nadciśnienia i o konieczności ich wczesnego rozpoznania i odpowiedniego leczenia, ze względu na odległe powikłania takie jak przerost lewej komory serca, uszkodzenie ściany tętnic. Kolejno Doktorantka przedstawia charakterystykę IGF-1 i jego receptora, udział układu odpornościowego w patogenezie nadciśnienia pierwotnego, w tym czynniki prozapalne. Doktorantka scharakteryzowała też krótko wrodzoną odpowiedź immunologiczną, w tym komórki odpowiedzi niespecyficznej i ich receptory ze szczególnym uwzględnieniem receptorów rozpoznających wzorce: TLR, NLRs, NOD-like i inne powiązane z przewlekłym procesem zapalnym w ścianach naczyń krwionośnych. Odpowiedni podrozdział poświęcono także odpowiedzi swoistej i roli limfocytów regulatorowych w blokowaniu odpowiedzi zapalnej. Wstęp dobrze uzasadniał genezę pracy doktorskiej.

Badania przeprowadzono w grupie 39 dzieci z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym w wieku 10-18 lat. Grupę kontrolną stanowiło 35 dzieci bez nadciśnienia, w odpowiednim wieku. Kryteria włączenia i wyłączenia z badania zostały jasno przedstawione. U osób włączonych do badania wykonywano pomiar ciśnienia oraz ocenę masy LK metodą echokardiografii, mierzono grubość błony środkowej tętnic szyjnych oraz przeprowadzono analizę fali tętna i obliczono elastyczność tętnic. Do analizy włączono także parametry antropometryczne, pomiar glukozy i insuliny oraz profil lipidowy.

W rozdziale „materiały i metody” wyczerpująco opisane zostały techniki laboratoryjne stosowane w pracy, metoda real-time PCR, metody immunoenzymatyczne i cytometryczne.

Na podstawie eksperymentów badawczych Doktorantka stwierdziła, że u dzieci z nadciśnieniem w porównaniu do grupy kontrolnej ekspresja genu *NOD1*, *NOD2*, *RIPK*, *NLRP3*, *IGF-1R*, *IPAF*, *TGFbeta* jest obniżona a *IL1-beta* podwyższona. Stężenie IGF-1 w osoczu i w leukocytach oraz ekspresja IGF-1 nie różniła pomiędzy porównywanymi grupami. U dzieci z NT obserwowano natomiast spadek odsetka limfocytów i monocytów z ekspresją receptora dla IGF-1R. Na załączonym wykresie słupkowym brakuje odpowiednich znamienności statystycznych. U dzieci chorych na NT obserwowano również wzrost odsetka komórek TREG z ekspresją GARP i spadek z ekspresją LAP oraz wzrost LAP dodatnich limfocytów TREG pamięci immunologicznej. Skorelowano również poziom ekspresji IGF-1 z parametrami klinicznymi oraz ekspresją genów dla czynników prozapalnych. Znamiennej ujemną korelację zaobserwowano pomiędzy PWV, ciśnieniem skurczowym oraz grubością błony wewnętrznej tętnic szyjnych a ekspresją genu *IGF-1*. Potwierdzono także występowanie dodatniej korelacji pomiędzy ekspresją genu dla *IGF-1* i ekspresją genów dla badanych parametrów prozapalnych u dzieci z NT. Nie przedstawiono informacji czy podobna korelacja istnieje w przypadku dzieci normotensyjnych. Ekspresja *IGF-1* korelowała z odsetkiem TREG GARP+. Doktorantka odnotowała również istnienie ujemne korelacje pomiędzy ekspresją *NOD1* i *RIPK2* z PWV oraz *NOD2* ze skurczowym ciśnieniem tętniczym. Odsetek TREG i BREG istotnie korelował z ekspresją *IGF-1* *IL-1beta* oraz z odsetkiem limfocytów, monocytów i neutrofilów w ekspresją receptora dla IGF-1. W tabeli 12 prezentującej powyżej opisane wyniki brakuje informacji o znamienności statystycznej. Na podstawie wieloczynnikowej analizy regresji wskazano czynniki predykcyjne uszkodzenia układu sercowo-naczyniowego. Wykazano zależności pomiędzy stężeniem IGF-1 a ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym w aorcie, masą LK a niektórymi receptorami NLR, względną grubością ściany LK ze stężeniem cytokin prozapalnych oraz grubości błony wewnętrznej tętnic szyjnych a ekspresją genu dla *NLRP3*.

Rozdział „dyskusja” czyli omówienie wyników własnych na tle piśmiennictwa jest bardzo zwięzły, stanowiąc w dużym zakresie podsumowanie wyników. Część rozdziału to posumowanie otrzymanych wyników badań. Autorka podejmuje próbę analizy wyników dotyczących ekspresji i stężenia IGF-1 sugerując, zgodnie z wynikami innych autorów, że IGF-1 może pełnić rolę ochronną przed rozwojem NT. Otrzymane wyniki nie potwierdzają jednak tego założenia, co wymagałoby szerszego przedyskutowania. Brak zmian stężenia IGF-1 w populacji pediatrycznej z nadciśnieniem autorka tłumaczy mechanizmami kompensacyjnymi powiązаныmi z różnymi czynnikami wpływającymi na stężenie IGF-1. Jest jednak niejasne dlaczego sugerowane mechanizmy przestają funkcjonować w wieku dorosłym. Otrzymane

zależności pomiędzy stężeniem IGF-1 a markerami uszkodzenia układu krążenia, zgodne z wynikami innych autorów potwierdzają tezę o ochronnym działaniu IGF-1. Autorka wskazuje także na istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy ekspresją leukocytarnego IGF-1 a ekspresją genów *NOD1*, *NOD2*, *TGFbeta*, *IL-6* oraz *RIPK2*. Nie jest jasne dlaczego Doktorantka sugeruje, że wzrost IGF-1 jest odpowiedzią na wzmożoną aktywność czynników prozapalnych. Nie jest to potwierdzone eksperymentalnie ani w doniesieniach innych autorów. Nie przedyskutowano również braku zależności pomiędzy ekspresją receptora dla IGF-1 a stężeniem IGF-1 w osoczu. Zależności pomiędzy *NOD1* i *NOD2* a markerami zapalenia są również niewyjaśnione. Oczywiście wynika to z braku odpowiednich wyników badań na różnych grupach pacjentów oraz na zwierzętach i in vitro, na których można by było oprzeć dyskusję. *NOD1* i *NOD2* korelowały odwrotnie z markerami uszkodzenia układu krążenia. Podobne wyniki otrzymali inni autorzy na modelu zwierzęcym. W pracy wykazano, że ekspresja genów receptorów IPAF i NLRP3 jest obniżona u dzieci z NT. Znaczenie tego zjawiska nie jest jasne, choć jest wiązane przez Doktorantkę ze zjawiskiem zapalenia w ścianie naczyń oraz uszkodzeniami śródbłonna naczyniowego. Autorka sugeruje również, że udział w regulacji ciśnienia tętniczego odgrywają limfocyty TREG z markerem powierzchniowym GARP. Mechanizm tego zjawiska jest nieznan i nie został zaproponowany.

Pracę kończy podsumowanie oraz wnioski. Słusznym wnioskiem jest stwierdzenie, że istnieją różnice w patogenezie pierwotnego NT u dzieci a rozwojem tego zaburzenia u dorosłych. Wniosek nr 2 dotyczący udziału odpowiedzi immunologicznej wrodzonej w patogenezie nadciśnienia jest w połowie słuszny. Druga część wniosku, w którym Doktorantka sugeruje, że zaburzenia w zakresie odpowiedzi wrodzonej nie są przyczyną zaburzenia a skutkiem (próbą kompensacji) nie jest odpowiednio uzasadniony. Pozostałe wnioski są ostrożnie sformułowane i nie budzą zastrzeżeń.

W podsumowaniu recenzji chciałabym podkreślić znaczenie przedstawianych w pracy zagadnień. Choroby sercowo-naczyniowe i ich konsekwencje są plagą współczesnej cywilizacji. Coraz bardziej alarmujące statystyki pokazują na narastanie problemu już od najwcześniejszych lat życia. Wartościowe jest również pokazanie, że NT pierwotne dotyka także dzieci i do tej grupy należy kierować działania diagnostyczne, i terapeutyczne, być może również zależne od zmian w układzie odpornościowym.

W posumowaniu oceny pracy mgr Renaty Grzywa-Czuba pragnę podkreślić, iż praca stanowi oryginalny dorobek naukowy doktorantki. Jest dowodem jego pracowitości i

umiejętności realizowania badań naukowych. Przedstawiona do oceny praca doktorska niewątpliwie zachęca do stawiania dalszych pytań dotyczących opisywanego zagadnienia a wyniki pracy warte są szerokiego rozpowszechnienia w środowisku lekarskim

Stwierdzam, że praca mgr 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)" odpowiada kryteriom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych.

Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” wniosek o dopuszczenie mgr Renaty Grzywa-Czuba do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab n. med. Urszula Demkow

