

mgr Renata Grzywa-Czuba

**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)**

1. Streszczenie

1.1. Wprowadzenie

Nadciśnienie tętnicze pierwotne (NTP) jest złożonym etiologicznie zespołem chorobowym. Charakteryzuje się obecnością przewlekłego systemowego zapalenia o niewielkim nasileniu. Zaburzenia immunologiczne towarzyszące temu schorzeniu, dotyczą układu odporności naturalnej (aktywacja monocytów, makrofagów, obecność szerokiego spektrum odpowiedzi białek ostrej fazy, etc) oraz układu odporności adaptacyjnej (zaburzenia fenotypu i funkcji limfocytów T). Większość badań, dotycząca roli zaburzeń immunologicznych w etiologii NTP, wykonano na modelach zwierzęcych. Nieliczne doniesienia dotyczą badań wykonanych u ludzi. Większość z nich dotyczy osób dorosłych, z często obciążonym wywiadem (palenie tytoniu, używki, nawyki żywieniowe, przebyte choroby, etc), co utrudnia interpretację uzyskanych wyników. Badania immunologiczne w grupie dzieci i młodzieży z NTP minimalizują efekty uboczne związane z trybem życia, co pozwala na bardziej wiarygodne powiązanie wyników badań immunologicznych z profilem klinicznym NTP już we wczesnych etapach tego zespołu. Nadciśnienie tętnicze pierwotne stanowi główną postać nadciśnienia tętniczego u dzieci w wieku szkolnym. Jednak często zostaje zdiagnozowane dopiero u nastolatków. Na regulację ciśnienia tętniczego krwi wpływa wiele czynników zarówno ze strony układu endokrynnego, nerwowego oraz immunologicznego, jak również czynniki genetyczne i środowiskowe (teoria mozaikowa Page'a). Bardzo ważne jest zrozumienie tych zależności dla poznania patomechanizmu rozwoju NTP, które jest główną przyczyną powikłań sercowo-naczyniowych oraz udarów.

Insulinopodobny czynnik wzrostu, jego receptor oraz NOD-podobne receptory mogą odgrywać istotne znaczenie w patologii pierwotnego nadciśnienia tętniczego w populacji pediatrycznej. Ocena interakcji pomiędzy tymi parametrami stanowi cel tych badań nad immunologią nadciśnienia tętniczego.

IGF-1 jest hormonem, który reguluje wzrost, różnicowanie i metabolizm komórkowy. Głównym źródłem IGF-1 jest wątroba a wydzielany jest pod wpływem ludzkiego hormonu wzrostu (hGH). Lokalnie produkowany jest w IGF-1 w różnych tkankach, w tym w komórkach mięśni gładkich naczyń i komórkach śródbłonka. Odgrywa ważną rolę w fizjologii układu sercowo-naczyniowego. Bierze udział w regulacji przepływu i ciśnienia krwi poprzez stymulację aktywności endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS) i produkcji tlenu azotu (NO) w komórkach śródbłonka. Czynnik IGF-1 ma również szerokie działania immunomodulacyjne. Poziom IGF-1 ujemnie koreluje z wiekiem. Brak jest danych dotyczących wpływu leukocytarnego *IGF-1* na parametry kliniczne NTP u dzieci. Peptydowe

czynniki wzrostu wpływają na reorganizację naczyń krwionośnych. Fakt ten może mieć ogromne znaczenie w ocenie uszkodzenia naczyń i określeniu kierunku rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych. To samo dotyczy ekspresji transbłonowego receptora dla czynnika insulinopodobnego wzrostu (IGF-1R). Wazodylatacja naczyń zależy od oporności receptora na działanie IGF-1. Polimorfizmy receptora dla IGF-1 określają podatność genetyczną na rozwój nadciśnienia tętniczego.

Podkreśla się również kluczową rolę receptorów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych, ostatnio Nod-podobnych (NLRs). NLRs należą do cytozolowych receptorów odporności naturalnej. Rozpoznają one zewnętrzne bodźce – pochodzące od patogenów (PAMPs – *ang. pathogen-associated molecular patterns*, molekularne wzorce związane z patogenem) oraz komórek gospodarza w wyniku działania stresu oraz uszkodzenia komórkowego (DAMPs – *ang. damage-associated molecular patterns*, molekularne wzorce związane z uszkodzeniem). Niewielki wzrost czynników prohipertensyjnych, t.j. angiotensyna II (Ang II), homocysteina, oksydowane lipoproteiny o małej gęstości (oxLDL, *ang. oxidized low density lipoprotein*), aldosteron oraz kryształy wapnia aktywują system wrodzonej odporności, który wyzwała lub pogłębia nadciśnienie. Znaczenie w patogenezie chorób metabolicznych, w tym w nadciśnienia tętniczego najlepiej poznano dla NLRP3. Aktywacja NOD1, NOD2 oraz IPAF (NLRC4) mogą mieć także wpływ na zmianę równowagi immunologicznej oraz parametrów sercowo-naczyniowych w nadciśnieniu tętniczym pierwotnym.

1.2. Cel/e pracy

Głównym celem badań było określenie: a) 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; b) stężenia IGF-1 w osoczu dzieci z NTP; c) ekspresji receptora CD221 (*IGF-1R*) w subpopulacjach leukocytów krwi obwodowej; d) dystrybucji regulatorowych limfocytów T i B we krwi obwodowej. Oceniono związek tych czynników z parametrami biochemicznymi i klinicznymi.

1.3. Materiały i metody

Do badania zrekrutowano 74-osobową populację, którą odpowiednio podzielono na 2 grupy uwzględniając odpowiednie kryteria:

a) grupa badana: 39 pacjentów pediatrycznych (29 chłopców i 10 dziewcząt) z Kliniki Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego IPCZD w Warszawie z rozpoznaniem nadciśnieniem tętniczym pierwotnym (NTP)

b) grupa kontrolna: 35 dzieci normotensyjnych (19 chłopców i 16 dziewcząt)

U każdej osoby wykonano badania obejmujące: ocenę uszkodzenia narządowego (wskaźnik masy lewej komory serca (LVMI), grubość kompleksu błona wewnętrzna – błona środkowa tętnic szyjnych wspólnych (cIMT), przekrój ściany tętnic szyjnych wspólnych (WCSA), elastyczność dużych tętnic (PWV, PWA) - standardowymi technikami (USG, metoda oscylometryczna - szybkość fali tętna, analiza fali tętna).

W zakresie badań laboratoryjnych wykonywane zostały:

- a) oznaczenia parametrów biochemicznych (glukoza, insulina, profil lipidowy) – z surowicy krwi
- b) badania molekularne metodą ilościową PCR w czasie rzeczywistym – oznaczono ekspresję genów: *IGF-1*, receptora dla IGF-1 (*IGF-1R*), receptorów NOD-podobnych (*NOD1*, *NOD2*, *NLRP3*, *IPAF*), kinazy *RIPK2*, *ASC*, *kaspazy-1* oraz cytokin zapalnych: *TGF-β*, *IL-6*, *IL-18*, *IL-1β* - z krwi pełnej
- c) badania immunologiczne:
- oznaczenie ekspresji receptora IGF-1 oraz określenie dystrybucji subpopulacji limfocytów T-reg i B-reg (cytometria przepływowa) – z krwi pełnej
 - oznaczenie stężenia IGF-1 (test ELISA) w osoczu krwi

1.4. Wyniki

Wyniki badań analizowano przy pomocy programu statystycznego Statistica TIBCO Statistica wersja 13.3 (StatSoft Polska Sp. z o.o., TIBCO Software Inc.). Zastosowano nieparametryczne testy: test Manna-Whitney'a oraz korelacje rang Spearmana. Dodatkowo wykonano analizę regresji wielorakiej. Statystycznie istotne różnice były wykazywane przy $p < 0,05$.

Otrzymano istotną statystycznie obniżoną ekspresję genów: *NOD1* ($p=0,0002$), *NOD2* ($p=0,00004$), *RIPK2* ($p=0,0161$), *NLRP3* ($p=0,0007$), *IGF-1R* ($p=0,0017$), *IPAF* ($p=0,0054$), *TGF-β* ($p=0,0022$) oraz podwyższoną *IL-1β* ($p=0,025$) u dzieci z nadciśnieniem tętniczym pierwotnym w stosunku do grupy kontrolnej.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic zarówno w ekspresji genu *IGF-1* w leukocytach i stężeniu IGF-1 w osoczu pomiędzy badanymi grupami.

Ponadto otrzymano obniżony odsetek limfocytów ($p=0,02$) i monocytów z ekspresją receptora dla IGF-1 ($p=0,0003$) oraz limfocytów T regulatorowych z ekspresją LAP (T-reg LAP+) u dzieci z NTP. Natomiast uzyskano znacznie podwyższony odsetek limfocytów T-regulatorowych z ekspresją GARP (T-reg GARP+) w tej grupie.

W badaniach otrzymano liczne zależności, z których najważniejsze statystycznie istotne to:

- a) poziom ekspresji genu *IGF-1* korelował ujemnie z parametrami klinicznymi: PWV ($r = -0,49$), wartością skurczowego ciśnienia tętniczego ($-0,44$), cIMT ($-0,43$)
- b) poziom ekspresji genu *IGF-1* korelował dodatnio z ekspresją genów wybranych parametrów odpowiedzi immunologicznej (*NOD1*, *NOD2*, *RIPK2*, *IL-6*, *TGF-β*) oraz odsetkiem limfocytów T-regulatorowych z ekspresją GARP ($r=0,42$) i LAP ($r=0,43$)
- c) poziom ekspresji genu receptora *IGF-1* korelował ujemnie z PWV ($r = -0,42$), wartością skurczowego ciśnienia tętniczego ($-0,41$)
- d) poziom ekspresji genu receptora *IGF-1* korelował dodatnio szczególnie z ekspresją genów: *NOD1* ($r=0,95$), *NOD2* ($r=0,90$), kinazą *RIPK2* ($r=0,91$) oraz cytokin *IL-6* ($r=0,76$), *TGF-β* ($r=0,79$)
- e) poziom ekspresji genu *NOD1* korelował ujemnie z PWV ($r = -0,45$), a *NOD2* z ciśnieniem tętniczym skurczowym krwi ($r = -0,46$) f) odsetek populacji limfocytów mT-regulatorowych LAP+ korelował ujemnie z wartością IMTR ($r = -0,55$), natomiast limfocyty T-reg GARP+ z RWT ($r = -0,47$)

1.5. Wnioski

Na podstawie powyższych wyników i istniejących publikacji można stwierdzić, że stan immunologiczny i metaboliczny w populacji pediatrycznej z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym jest odmienny w porównaniu do dorosłych.

U młodzieży z nadciśnieniem tętniczym obserwuje się spadek ekspresji genów parametrów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (*NOD1*, *NOD2*, *RIPK2*, *NLRP3*, *IPAF*, *TGF-β*) w leukocytach, co może świadczyć o działaniu różnych mechanizmów kompensujących patologiczny wzrost ciśnienia tętniczego krwi.

Natomiast nie obserwuje się różnic w stężeniu hormonu czynnika insulinopodobnego wzrostu-1 w osoczu oraz ekspresji genu *IGF-1* w leukocytach. Pomimo tego wyniki korelacji pokazują, że poziom ekspresji genów receptorów *NOD1* i *NOD2* może mieć wpływ na poziom ekspresji genu *IGF-1*.

W regulacji nadciśnienia tętniczego u badanych nastolatków z NTP istotne znaczenie mają limfocyty T-regulatorowe z ekspresją GARP (większy odsetek w grupie z NTP).