

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz Magdaleny Bosak-Prus  
pt. „Ocena profilu oreksyny A i greliny u dzieci niskorosłych”

Wzrastanie u człowieka jest niezwykle złożonym procesem, zainicjowanym przez wytwarzany w przednim płacie przysadki hormon wzrostu, który stymuluje produkcję kilku peptydów pośredniczących, zwanych somatomedinami oraz ich białek wiążących. Proces wzrostu regulują czynniki genetyczne, hormonalne i środowiskowe.

W okresie płodowym wzrastanie zależy w znacznej mierze od stanu odżywienia płodu, a determinowane jest przez czynność łożyska oraz stan odżywienia i zdrowia matki. W tym okresie szczególną rolę odgrywają czynniki wzrostowe, jak czynnik wzrostu fibroblastów (FGF= *fibroblast growth factor*), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF= *epidermal growth factor*), cytokiny z nadrodziny transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$  = *transforming growth factor*) i czynnika wzrostu nowotworów (TNF= *tumor necrosis factor*) oraz hormony, białka transportujące, receptory oraz białka wewnątrzkomórkowe przenoszące sygnał z kompleksu hormon-receptor. Natomiast w życiu pozapłodowym na wzrastanie wpływa przede wszystkim ós hormon wzrostu (GH= *growth hormon*) – insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1= *insulin-like growth factor 1*) i typ 3 białka wiążącego IGF-1 (IGFBP-3) oraz hormony tarczycy, a w okresie dojrzewania dodatkowo steroidy płciowe.

Na proces wzrastania wpływają również neuroprzekaźniki podwzgórzowe, tj.: czynnik uwalniający GH (somatoliberyna = GHRH), który zwiększa amplitudę pulsów GH oraz czynnik hamujący GH (somatostatyna), zmniejszający wydzielanie GH, jak i częstość pulsów.

Patomechanizm niedoboru wzrostu zależy w głównej mierze od okresu, w którym wystąpiło działanie czynników negatywnie wpływających na proces wzrastania. We wczesnym okresie życia dziecka, co najbardziej jest widoczne do ok. 2 roku życia, proces wzrastania jest w znacznym stopniu uzależniony od stanu odżywienia. Prawidłowa dieta pokrywająca zapotrzebowanie energetyczne i białkowe, zawierająca odpowiednią ilość witamin i soli mineralnych sprzyja prawidłowemu wzrastaniu. Niedobory jakościowe i ilościowe, wynikające z uwarunkowań socjoekonomicznych, kulturowych czy psychosocjalnych mają wpływ na obniżenie toru wzrastania u dziecka.

Zarówno stan odżywienia, jak i prawidłowa funkcja układu hormonalnego, immunologicznego i nerwowego są ze sobą nierozdzielnie powiązane. Promują albo hamują wzrastanie i dalszy rozwój.

Jednym z najsilniejszych stymulatorów wydzielania hormonu wzrostu jest grelina, odkryta i opisana po raz pierwszy w 1999 roku przez Kojimę i wsp., wyizolowana z żołądka szczura, początkowo traktowana jako ligand dla zidentyfikowanego trzy lata wcześniej receptora GHR-S (*growth hormone secretagogues receptor*), a więc receptora dla związków stymulujących wydzielanie GH drogą alternatywną w stosunku do klasycznej stymulacji GHRH. Receptory dla greliny znajdują się w przysadce, podwzgórzu, sercu i tkance tłuszczowej. Fakt, iż receptory dla greliny są zlokalizowane głównie w przedniej części przysadki, na somatotropach wpłynął na zmianę poglądu w zakresie regulacji i funkcjonowania osi somatotropinowej przysadki. Wiadomo, że grelina aktywuje transkrypcję czynnika PIT-1, który odpowiada za różnicowanie i proliferację komórek przedniego płata przysadki oraz ekspresję genu dla GH. Wpływ ten zależy od dawki i czasu działania greliny, co potwierdza jej olbrzymią rolę w procesie kontroli rozwoju i wzrastania organizmu. Istnieje pogląd, że niedobór greliny może stanowić jedną z istotnych przyczyn deficytu hormonu wzrostu. Grelina wpływa także na metabolizm glukozy, homeostazę energetyczną organizmu, motorykę żołądka, układ sercowo- naczyniowy, rozwój gonad i prawidłowy sen. Znana jest też funkcja greliny jako czynnika oreksygenicznego. W przypadku głodzenia i spadku masy ciała dochodzi do wzrostu jej stężenia i stymulacji uwalniania NPY i AGRP (*agouti related peptide*) z jądra łukowatego podwzgórza, a za pośrednictwem tego peptydu do unieczynniania receptora MCH-4 i zahamowania anorektycznego działania  $\alpha$ -MSH.

Równie wielokierunkowe działanie wykazują oreksyny, syntetyzowane głównie w neuronach zlokalizowanych w obszarze bocznym podwzgórza. Ekspresję oreksyny A (OxA) wykazano w narządach obwodowych i gruczołach wydzielania wewnętrznego. Rozległe występowanie zakończeń neuronów oreksynowych i receptorów dla oreksyn w układzie nerwowym i tkankach obwodowych wskazuje na złożoną ich rolę w organizmie. Wydaje się, że ich wpływ nie ogranicza się wyłącznie do funkcji neurotransmitera i/ lub neuromodulatora, ale wydzielane do krwioobiegu pełnią również funkcję hormonu. Włókna oreksynowe rozmieszczone są w obszarach podwzgórza kontrolujących proces uwalniania hormonów przysadkowych. Wpływ dokomorowego wstrzyknięcia OxA na stężenie podwzgórzowej somatostatyny i poziom mRNA

somatoliberyny wskazuje na jego współdziałanie w obrębie systemów zaangażowanych w kontrolę łaknienia i sekrecję GH.

W dostępnej literaturze brakuje informacji o wpływie greliny i OxA na rozwój i proces wzrastania u dzieci oraz badań dotyczących stężeń tych hormonów we krwi u dzieci niskorosłych z somatotropinową niedoczynnością przysadki.

Dlatego też należy z uznaniem przyjąć wybór tematu rozprawy doktorskiej, w której lekarz Magdalena Bosak-Prus podjęła próbę oceny stężeń greliny i oreksyny A w surowicy krwi u dzieci niskorosłych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa, licząca 100 stron maszynopisu, składa się z rozdziałów typowych dla tego rodzaju prac.

We wstępie doktorantka szeroko omawia zagadnienia dotyczące samego procesu wzrastania, ale i zaburzeń wzrastania u dzieci, prowadzących do niskorosłości. Następnie omawia epidemiologię, etiologię i symptomatologię somatotropinowej niedoczynności przysadki (SNP). Szczegółowo przedstawia metody diagnostyki SNP oraz w skrócie opisuje metodę terapii tego schorzenia. Następnie szeroko omawia strukturę greliny i dobrze poznane już funkcje, jakie pełni ten hormon w organizmie człowieka. Zwraca uwagę na wielokierunkowe działanie greliny, zarówno na drodze neuroendokrynnej, jak i auto- oraz parakrynnej, o czym może świadczyć fakt występowania jej receptorów w wielu narządach, m.in. w przysadce, podwzgórzu, hipokampie, sercu, tkance tłuszczowej, płucach, jelitach oraz gruczołach wydzielania wewnętrznego. Podkreśla, iż udowodniono synergistyczny wpływ greliny i somatoliberyny na wydzielanie hormonu wzrostu, lecz stosowanie greliny w terapii SNP nie znalazło jak dotąd zastosowania z uwagi na jej wpływ pobudzający sekrecję innych hormonów tropowych przysadki, w tym ACTH. Następnie omawia budowę i funkcje biologiczne oreksyn, ze szczególnym uwzględnieniem oreksyny A. Sygnalizuje, iż w literaturze są sprzeczne doniesienia na temat wpływu oreksyn na wydzielanie hormonu wzrostu. Jedne badania doświadczalne wskazują na pobudzający wpływ oreksyn na wydzielanie GH, zaś inne dowodzą hamującego wpływu oreksyn na sekrecję endogennego GH-RH, a tym samym pośrednio GH.

Doktorantka wyznaczyła sobie następujące cele pracy:

1. Ocena profilu OxA i greliny u dzieci niskorosłych przed okresem dojrzewania.
2. Ustalenie powiązań pomiędzy stężeniem OxA i greliny a wydzielaniem GH w godzinach nocnych i w teście stymulacji u dzieci niskorosłych, w tym:
  - a. z prawidłowym wydzielaniem GH w profilu nocnym i testach stymulacji (grupa GI)

- b. z nieprawidłowym wydzielaniem GH w profilu nocnym i testach stymulacji (zdiagnozowane SNP) (grupa GII).
- c. z nieprawidłowym wydzielaniem GH w profilu nocnym i prawidłową sekrecją GH w testach stymulacji (wykluczone SNP) (grupa GIII).
3. Ocena korelacji między profilem greliny i OxA a współczynnikiem masy ciała (BMI) pacjentów niskorosłych.
4. Porównanie uzyskanych wyników dzieci niskorosłych z homologiczną grupą dzieci zdrowych (grupa GK).

Założenia i cele pracy uważam za zasadne. Do badań wybrano dwie grupy dzieci niskorosłych, u których na podstawie testu nocnego i/lub testów stymulacyjnych oceniających stężenie hormonu wzrostu we krwi wykluczono somatotropinową niedoczynność przysadki, grupę dzieci z rozpoznaną SNP oraz grupę dzieci zdrowych bez zaburzeń wzrastania, stanowiących grupę kontrolną.

Badaniami objęto 64 dzieci niskorosłych, w tym 22 dziewczęta i 42 chłopców w wieku przedpokwitaniowym (od 3- 13 roku życia), diagnozowanych w Klinice Endokrynologii i Diabetologii Wzrostu i Rozwoju UM we Wrocławiu oraz grupę kontrolną 19 dzieci (w tym 6 dziewcząt i 13 chłopców) z prawidłowym wzrostem i masą ciała.

U wszystkich badanych dzieci doktorantka przeprowadziła szczegółowe badanie podmiotowe i przedmiotowe z uwzględnieniem pomiarów antropometrycznych, oceniła wiek kostny, a u dzieci niskorosłych przeanalizowała wyniki badań krwi oceniających rezerwę przysadki w zakresie wydzielania hormonu wzrostu. Oznaczyła stężenia oreksyny A, greliny, IGF-1, IGFBP-3 i glikemię w surowicy krwi.

Doktorantka zastosowała prawidłowo dobrane metody statystyczne.

W przeprowadzonych badaniach doktorantka wykazała najwyższe stężenia OxA w surowicy krwi w grupie dzieci niskorosłych z prawidłowym wydzielaniem GH podczas snu, zaś najniższe w grupie pacjentów z niskim stężeniem GH w profilu nocnym i prawidłową sekrecją w testach stymulacji. U dzieci z większym deficytem wzrostu ( $SD$  wzrostu  $\leq - 2,5$ ) stężenie OxA było wyższe niż u tych z mniejszym deficytem wzrostu ( $SD$  wzrostu  $> - 2,5$ ).

W grupie dzieci z prawidłowym wydzielaniem hormonu wzrostu podczas snu wykazała dodatnią korelację pomiędzy średnim stężeniem OxA w surowicy krwi a odchyleniem standardowym stężenia IGF-1. U dzieci niskorosłych z prawidłowym wydzielaniem GH zanotowała tendencję do dodatniej zależności pomiędzy glikemią na czczo, a stężeniem OxA w surowicy krwi.

Wykazała ponadto, że średnie stężenie greliny w surowicy krwi było istotnie statystycznie wyższe u dzieci zdrowych w porównaniu do dzieci z SNP. Nie było różnic statystycznie znamiennych pomiędzy stężeniem greliny w surowicy krwi w poszczególnych grupach dzieci z deficytem wzrostu. U dzieci z prawidłowym wydzielaniem GH w testach stymulacji stwierdziła ujemną, istotnie statystyczną zależność pomiędzy stężeniem greliny we krwi a odchyleniem standardowym IGF-1. U wszystkich badanych niskorosłych dzieci łącznie wykazała ujemną, istotną statystycznie korelację pomiędzy masą ciała a stężeniem greliny we krwi oraz dodatnią pomiędzy wiekiem kostnym, a stężeniem IGF-1.

Charakterystykę badanych grup dzieci oraz wyniki badań doktorantka przedstawiła w 26 tabelach i na 24 rycinach, które zamieściła w tekście pracy.

W dyskusji, która zawiera 11 stron maszynopisu, w tym 4 rozdziały i 13 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 dobrym przygotowaniu merytorycznym doktorantki i znajomości piśmiennictwa.

W rozprawie doktorantka zamieściła 119 pozycji piśmiennictwa, w tym polskiego i anglojęzycznego. Piśmiennictwo jest prawidłowo dobrane i aktualne.

W oparciu o uzyskane wyniki doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. Stężenie greliny jest obniżone zarówno u pacjentów ze zdiagnozowaną somatotropinową niedoczynnością przysadki, jak i w grupie niskorosłych dzieci, u których wydzielanie GH po zaścięciu było prawidłowe w porównaniu z dziećmi z grupy kontrolnej, co może przemawiać za defektem syntezy greliny w grupie dzieci z niedoborem wzrostu.
2. W grupie dzieci z prawidłowym wydzielaniem GH w testach stymulacji wykazano ujemną zależność pomiędzy stężeniem greliny, a odchyleniem standardowym IGF-1, co może sugerować, że grelina moduluje osoczowe stężenie IGF-1 na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego.
3. U wszystkich badanych niskorosłych dzieci oraz dzieci z grupy kontrolnej stężenie greliny ujemnie korelowało z masą ciała. Wskazuje to na stymulujący wpływ greliny na łaknienie.
4. U dzieci z prawidłowym wydzielaniem GH w godzinach nocnych wykazano dodatnią zależność pomiędzy stężeniem OxA, a odchyleniem standardowym IGF-1, co pozwala przypuszczać, że adekwatna do stopnia rozwoju pacjentów sekrecja OxA korzystnie wpływa na produkcję IGF-1.

5. U niskorosłych dzieci stwierdzono tendencję do ujemnej zależności pomiędzy stężeniem OxA a stopniem niedoboru wzrostu u dziecka. U dzieci z dużym deficytem wzrostu ( SD wzrostu  $> - 2,5$ ) stężenie OxA było wyższe w porównaniu z dziećmi, u których niedobór wzrostu był mniejszy ( SD wzrostu  $< - 2,5$ ), co może przemawiać za hamującym wpływem OxA na oś somatotropinową.

6. Nie wykazano zależności między stężeniem oreksyny A, a wydzielaniem GH u dzieci niskorosłych.

Korzystając z przywileju i obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia, których można by uniknąć przy ewentualnym przygotowaniu pracy do druku.

Dokładniejszego przedstawienia, bo z pewnością takie opracowanie było wykonane podczas rekrutacji dzieci do badań wymaga charakterystyka grupy. Nie podano bowiem ani w tekście, ani w tabeli średnich pomiarów antropometrycznych z odchyleniem standardowym (wzrost, masa ciała, BMI), stopnia dojrzałości płciowej i wieku kostnego badanych dzieci. Jaka była istotnie liczebność grupy kontrolnej, ponieważ w tabeli I podano, że było badanych 17 dzieci, a w tekście napisano, że 19 dzieci.

W celach pracy (str. 38) wyszczególniono, że grupę GIII stanowiły dzieci z nieprawidłowym wydzielaniem GH w profilu nocnym i prawidłową sekrecją GH w testach stymulacyjnych, a więc z wykluczoną SNP. To wydaje się recenzentowi logiczne przy podziale dzieci niskorosłych na dwie grupy, tzn. te, u których nie rozpoznano SNP z uwagi na prawidłowe wydzielanie GH zarówno w profilu nocnym, jak i w testach stymulacji (grupa GI) oraz te, u których było nieprawidłowe wydzielanie GH wyłącznie w profilu nocnym, ale prawidłowa sekrecja GH w testach stymulacyjnych (grupa GIII). Są to dwie grupy dzieci, u których na podstawie przyjętych i ogólnie obowiązujących kryteriów diagnostycznych nie rozpoznaje się somatotropinowej niedoczynności przysadki. Natomiast w metodyce (str. 39) doktorantka podaje, że do grupy GIII zakwalifikowano dzieci z częściowym niedoborem GH, u których przynajmniej jedno oznaczenie GH mieściło się w przedziale 5,1- 9,9 ng/ml. To wymaga wyjaśnienia i poprawienia. Dlatego też właśnie szkoda, że nie podano wyników średnich oznaczeń GH w poszczególnych grupach w charakterystyce grupy, ani w tabeli ani w tekście. To z pewnością rozwiałoby wątpliwości i pytania recenzenta.

W celach pracy, ale już także w samym tytule pracy, który brzmi „Ocena profilu oreksyny A i greliny u dzieci niskorosłych” doktorantka nie podaje w jakim materiale biologicznym oznaczano grelinę i oreksynę. W tekście pracy także niezwykle rzadko doktorantka używa określenia „w surowicy”, zaś w opisie tabeli 2 i 5 użyła określenia „w osoczu”. Można się oczywiście domyślić, że jest to tylko błąd drukarski, ponieważ w metodyce badań wyraźnie podała, że oba te hormony były oznaczane w surowicy a nie w osoczu.

We wstępie pracy doktorantka opisuje najpierw grelinę, a następnie oreksynę. Zdaniem recenzenta wydaje się, że lepiej by było zacząć także przedstawiać zarówno metodykę oznaczeń, jak i wyniki badań oraz dyskusję właśnie od greliny a nie oreksyny.

Dobrze by było, gdyby doktorantka wyjaśniła w tekście jaka była przesłanka do oceny zależności pomiędzy wskaźnikiem IGF-1/IGFBP-3 a stężeniem greliny w surowicy krwi, tym bardziej, że nie przedstawiła tej zależności odnośnie oreksyny A.

Doktorantka omówiła dokładnie poszczególne prezentowane wyniki badań, jednakże ponieważ cele badań były dokładnie sprecyzowane, to wydaje się, że nie było konieczności omawiania tych wyników, które nie były bezpośrednim celem badań, np. stężenie IGF-1 a wiek kostny, czy glikemia na czczo, albo zależność pomiędzy wiekiem kostnym a wzrostem.

Wnioski powinny stanowić odpowiedź na cele badań. Według recenzenta wydają się zbyt rozbudowane, a wniosek 3 (cyt. „U wszystkich badanych niskorosłych dzieci oraz dzieci z grupy kontrolnej stężenie greliny ujemnie korelowało z masą ciała. Wskazuje to na stymulujący wpływ greliny na łaknienie”) jest zbyt daleko idący. Tak więc przed ew. przygotowaniem pracy do druku powinny zostać skrócone. Ponadto w streszczeniu doktoratu wnioski nieznacznie różnią się od tych w tekście pracy. Jest ich siedem, a nie sześć, na co też należy zwrócić uwagę przy redagowaniu pracy.

W pracy pojawiły się też drobne błędy literowe. Jednak wszystkie przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości tej interesującej i dobrze zaplanowanej rozprawy doktorskiej.

W moim przekonaniu praca lekarz Magdaleny Bosak-Prus spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych.

Zwracam się zatem do Pana Dziekana i Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lekarz Magdaleny Bosak-Prus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dziękuję za przywilej recenzowania tej pracy.

Dr hab. n. med. Katarzyna Ziara

**KIEROWNIK**  
Katedry i Kliniki Pediatrii  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

  
dr hab. n. med. Katarzyna Ziara