

Kraków, 08.04. 2019 r.

Dr hab. n. med. Agata Baldys-Waligórska
Katedra Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii
Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego
ul. G. Herlinga-Grudzińskiego 1
30-705 Kraków

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. med. Mai Jończyk

**Związek między polimorfizmem genu receptora TLR2 i TLR4 oraz
stężeniem IL-6 i TNF- α a wybranymi parametrami metabolicznymi
w zespole policystycznych jajników u młodych kobiet**

Promotor:

prof. dr hab. n. med. Marek Bolanowski

Zespół wielotorbielowatych jajników (PCOS) jest jedną z najczęściej rozpoznawanych u kobiet w wieku reprodukcyjnym endokrynopatii, i w zależności od przyjętych kryteriów stanowi około 6-25%. Zaburzenia miesiączkowania, brak owulacji, niepłodność, obecność drobnotorbielowatych jajników oraz biochemiczne i/lub kliniczne cechy hiperandrogenizmu to podstawowe cechy tego zespołu.

U pacjentek z tym schorzeniem występują również zaburzenia metaboliczne takie jak otyłość brzuszna, insulinooporność (IR) czy dyslipidemia aterogenna, które są udokumentowanymi czynnikami ryzyka wystąpienia schorzeń układu sercowo-naczyniowego, nadciśnienia, miażdżycy oraz cukrzycy typu 2. Schorzenia te składają się na rozpoznanie zespołu metabolicznego (MS).

Etiopatogeneza PCOS nie jest do końca wyjaśniona. Istnieje kilka teorii PCOS biorących pod uwagę czynniki genetyczne, przedwczesną adrenarche, zaburzenia pulsacji GnRH powodujące nadmierne wydzielanie LH, defekt syntezy androgenów jajnikowych i/lub nadnerczowych, a także insulinooporność, wiążącą PCOS z zespołem metabolicznym, którego częstość u kobiet z PCOS jest dwa razy większa niż w populacji ogólnej.

W patogenezie zespołu metabolicznego niewątpliwą rolę oprócz IR odgrywa przewlekły stan zapalny o niskim stopniu nasilenia, o czym świadczą podwyższone stężenia białka C-reaktywnego (CRP), niektórych cytokin, chemokin czy inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1). Źródłem niektórych czynników prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF- α , chemokiny) może być tkanka tłuszczowa.

Istotną rolę w przebiegu reakcji zapalnej odgrywają receptory Toll-like (TLR), którym ostatnio poświęca się wiele badań dotyczących nie tylko mechanizmów odporności immunologicznej. Ich pobudzenie indukuje szlaki sygnałowe prowadzące do produkcji cytokin prozapalnych, w tym IL-6 i TNF- α . W otyłości obserwuje się nadmierną ekspresję i aktywację szczególnie dwóch typów receptorów TLR - 2 i - 4, które odgrywają również rolę w patogenezie IR, miażdżycy, DM2 i MS.

Przypuszcza się, że zapalenie o niskim stopniu nasilenia może być składową PCOS, wynikającą nie tylko ze współistniejących z zespołem zaburzeń metabolicznych.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych lek. med. Mai Jończyk została przedstawiona do recenzji jako opracowany 130. stronicowy maszynopis zawierający 37 tabel i 16 rycin, 197 pozycji piśmiennictwa ułożonych w kolejności alfabetycznej. Praca ma typowy układ rozdziałów, są to: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, spis rycin i tabel, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metodyka, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo.

Wstęp

W obszernym i dobrze udokumentowanym przeglądzie piśmiennictwa wstępie, Autorka pracy zdefiniowała zespół policystycznych jajników, przedstawiła jego epidemiologię oraz kryteria rozpoznania. Przedstawiła też wyczerpująco wyniki dotychczasowych badań dotyczące patogenezy, objawów klinicznych, zaburzeń hormonalnych (hiperandrogenizm) i metabolicznych (otyłość, insulinooporność, zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej, nadciśnienie tętnicze). Wykazała się dobrą znajomością piśmiennictwa na temat

wartości diagnostycznej tradycyjnych wskaźników zaburzeń metabolicznych i hormonalnych w zespole policystycznych jajników.

Opierając się na ostatnich doniesieniach wskazujących na współistnienie przewlekłego stanu zapalnego o niewielkim stopniu nasilenia, Doktorantka rozważa udział komponenty zapalnej w patogenezie PCOS. Szczegółowo omawia znaczenie takich wskaźników zapalenia jak CRP, interleukina 6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), których wzrost wydzielania sprzyja rozwojowi zaburzeń metabolicznych spotykanych u tych pacjentek, a także dysfunkcji jajników i hiperandrogenizmowi.

Znaczącą część wstępu Doktorantka poświęciła omówieniu roli receptorów Toll-like (TLR) w zapaleniu i odpowiedzi immunologicznej, ponieważ nadmierną aktywację TLR (szczególnie podtypów 2 i 4) wiąże się z otyłością i IR, zarówno u zwierząt doświadczalnych jak i u ludzi. Bardzo szczegółowo i wnikliwie Autorka pracy omawia badania nad rolą TLR w zespole metabolicznym, będącym częścią PCOS.

Przypuszcza się, że TLR, zwłaszcza podtypy TLR2 i TLR4, mogą odgrywać pewną rolę w patogenezie PCOS. Autorka przedstawia badania, które dowodzą nadekspresji TLR2 i TLR4 u pacjentek z PCOS – prawdopodobnie TLR stanowią ogniwo łączące układ immunologiczny z układem rozrodczym wpływając na proces owulacji, a także na płodność.

Dotychczas opublikowano jedynie dwie prace dotyczące polimorfizmów genów TLR2 i TLR4 u kobiet z PCOS. W pierwszej badano wpływ polimorfizmów genów TLR2 i TLR4 na PCOS oraz ich zależność od otyłości, a w drugiej pracy wykazano, że polimorfizm TLR4-299A>G znacznie częściej występuje u kobiet z PCOS. Nie badano jednak interakcji z zaburzeniami metabolicznymi, jak również z otyłością.

Autorka pracy kierując się założeniem, że istotne znaczenie w patogenezie zespołu PCOS ma współistnienie przewlekłego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia, postawiła sobie ambitne zadanie zbadania związków pomiędzy zaburzeniami metabolicznymi i hormonalnymi u młodych kobiet z zespołem PCOS a stężeniem cytokin zapalnych IL-6 i TNF- α oraz występowaniem polimorfizmów genów TLR2 i TLR4.

Cel pracy

W recenzowanej pracy doktorskiej Autorka:

1. Porównała parametry metaboliczne i hormonalne kobiet z PCOS w odniesieniu do grupy kobiet prawidłowo miesiączkujących.
2. Oceniała stężenia IL-6 i TNF- α w grupie kobiet z PCOS w porównaniu do kobiet prawidłowo miesiączkujących.
3. Oceniała częstość występowania badanych polimorfizmów genów TLR2 i TLR4 u pacjentek z PCOS w porównaniu do grupy kontrolnej.
4. Zbadała wpływ polimorfizmów TLR2 i TLR4 oraz markerów zapalenia IL-6 i TNF- α na oceniane w projekcie parametry metaboliczne i antropometryczne.

Cel rozprawy został sformułowany jasno, jest dobrze uzasadniony, dobór tematu oceniam jako interesujący i istotny klinicznie, wnoszący nowe podejście do tematu PCOS.

Material i Metody

Do badania zakwalifikowano 78 kobiet w wieku od 19 do 39 lat.

Grupę badaną stanowiło 40 pacjentek w wieku 20-34 lata. Rozpoznanie PCOS postawiono na podstawie kryteriów rotterdamkich z 2003 roku. Pacjentki z PCOS zakwalifikowane do badania spełniały wszystkie trzy kryteria, w tym biochemiczne cechy hiperandrogenemii (testosteron całkowity $> 0,8$ ng/ml lub FAI $> 5\%$). Wykluczono inne schorzenia leżące u podłoża hiperandrogenizmu i zaburzeń miesiączkowania.

Grupa kontrolna obejmowała 38 pacjentek w wieku 19-39 lat. Stanowiły ją kobiety pracujące w Klinice oraz pacjentki hospitalizowane z powodu innych schorzeń. Wszystkie kobiety w grupie kontrolnej miesiączkowały regularnie i nie prezentowały cech hiperandrogenizmu. Badanie odbyło się w Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami we Wrocławiu. Doktorantka bardzo dobrze sformułowała kryteria wyłączenia z badania. Kryteria wykluczające z badania były identyczne dla obu grup.

Wszystkie uczestniczki, po uzyskaniu pełnej informacji (pisemnej i ustnej), wyraziły dobrowolną i świadomą zgodę na przeprowadzenie procedur, w tym na badania genetyczne. Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu nr KB 324/2016.

Zakres wykonywanych badań był szeroki i obejmował:

- dokładny wywiad ginekologiczny, badanie ginekologiczne, w tym ocena jajników za pomocą przezpochwowego badania ultrasonograficznego.
- Hiperandrogenizm oceniono klinicznie za pomocą skali Ferrimana-Gallweya oraz biochemicznie (oznaczając stężenia testosteronu całkowitego, androstendionu, SHBG, LH, FSH). Wyliczono wartość FAI.
- Pomiar antropometryczny : pomiar masy ciała i wysokości ciała, BMI , WHR
- Pomiar ciśnienia tętniczego
- Oceniono parametry metaboliczne: lipidogram, OGTT z oznaczeniem glikemii i stężenie insuliny na czczo, obliczono wskaźniki insulinooporności: HOMA – IR, QUICKI, Matsudy
- Wykonano oznaczenie stężenia parametrów zapalnych CRP, IL-6, TNF- α .
- Wykonano badania polimorfizmów genu TLR2 (rs3804099, rs3804100 i rs5743708) oraz TLR4 (rs4986790 i rs4986791) techniką PCR oraz metody minisekwencjonowania, a następnie dokonano identyfikacji badanych polimorfizmów.

Analizę statystyczną zaplanowano poprawnie i przeprowadzono przy użyciu programu Prism 5.0 oraz Statistica 10.

Wyniki

W omawianej pracy Autorka wykazała, że kobiety z PCOS charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami **pomiarów antropometrycznych** (BMI, WHR, obwód talii), a także istotnie wyższymi stężeniami badanych **parametrów metabolicznych** (stężenie insuliny na czczo, stężenie insuliny i glukozy w 120 minucie OGTT, stężenie trójglicerydów, wskaźnik HOMA-IR). Wskaźniki IR - QUICKI i Matsudy były istotnie mniejsze w grupie kobiet z PCOS. Istotnie mniejsze było również stężenie cholesterolu HDL.

W **testach hormonalnych** pacjentki z PCOS charakteryzowały się znacząco większym stężeniem testosteronu całkowitego, androstendionu oraz wartością FAI.

Badania **wskaźników zapalnych** wykazały znacząco większą liczbę WBC w grupie kobiet z PCOS oraz wyższe stężenia CRP i IL-6 w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie TNF- α było istotnie statystycznie mniejsze w grupie PCOS. Wykazano słabą dodatnią korelację pomiędzy stężeniem IL-6 a liczbą WBC, stężeniami CRP i glukozy na czczo oraz ujemną korelację stężenia TNF- α ze stężeniem SHBG u kobiet z PCOS.

Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów genu TLR2 (rs3804099, rs3804100 oraz rs5743708) nie różniła się istotnie pomiędzy grupą kontrolną a grupą kobiet z PCOS. Różnica w częstości genotypów polimorfizmów genu TLR4 (rs4986790 i rs4986791) była na granicy istotności statystycznej ($p=0,08$). Dodatkowo Autorka wykazała współwystępowanie obu polimorfizmów genu TLR4. Podobnie silna zależność dotyczyła również współwystępowania polimorfizmów N199N (rs3804099) i S450S (rs3804100) genu TLR2.

W grupie kobiet z PCOS nie wykazano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy poszczególnymi polimorfizmami genu TLR2 i TLR4 a **parametrami antropometrycznymi i metabolicznymi**. Wykazano związek pomiędzy stężeniem HDL a polimorfizmem S450S (rs3804100) TLR2 na granicy istotności statystycznej ($p=0,05$).

Na podstawie analizy korelacji pomiędzy polimorfizmami TLR2 i TLR4 a **parametrami hormonalnymi** wykazano istotną zależność pomiędzy dwoma polimorfizmami TLR4 (rs4986790 i rs4986791) i polimorfizmem rs3804100 genu TLR2 a stężeniem FSH.

Korelacja pomiędzy polimorfizmem rs3804099 genu TLR2 a stężeniem androstendionu była na granicy istotności statystycznej ($p=0,08$).

Dyskusja Autorki z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy została przeprowadzona wnikliwie i świadczy o dużej znajomości zagadnień związanych z zespołem PCO oraz z zespołem metabolicznym. Praca zawiera 197 pozycji aktualnego piśmiennictwa, głównie zagranicznego, które jest poprawnie cytowane w tekście. Doktorantka wykazała się dużą znajomością piśmiennictwa na temat stosunkowo niedawno odkrytych związków pomiędzy patomechanizmem przewlekłego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia i ekspresją receptorów TL a zespołem metabolicznym i zespołem policystycznych jajników.

Wnioski z przeprowadzonej pracy są odpowiedzią na sformułowane uprzednio cele pracy badawczej, co świadczy o przemyślanym zaplanowaniu pracy i realizacji wszystkich jej założeń.

Autorka wykazała, że kobiety z PCOS różniły się nie tylko profilem hormonalnym (stwierdzany w tej grupie hiperandrogenizm stanowi podstawę rozpoznania PCOS), ale również profilem metabolicznym. W porównaniu do kobiet bez cech tego zespołu częściej stwierdzano u nich otyłość typu centralnego, insulinooporność, hiperinsulinemię oraz zaburzenia lipidowe i gospodarki węglowodanowej, a także wyższe stężenia markerów zapalenia WBC, CRP, IL-6 oraz niższe stężenie TNF- α .

Częstość występowania poszczególnych polimorfizmów w zakresie genów receptora TLR2 w grupie PCO nie różniła się znamienne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej co przemawia za brakiem ich wpływu na patogenezę PCOS.

Autorka uważa, że różnica w częstości genotypów polimorfizmów genu receptora TLR4 w obu grupach na granicy istotności statystycznej, mogłaby wskazywać na ich potencjalną rolę w etiopatogenezie tego zespołu.

Doktorantka zbadała również wpływ polimorfizmów TLR2 i TLR4 oraz markerów zapalenia IL-6 i TNF- α na oceniane w projekcie parametry metaboliczne i antropometryczne dowodząc, że:

- - funkcje ochronną w procesie w procesie aterogenezy spełnia obecność allela C w zakresie polimorfizmu S450S TLR2
- - polimorfizm N199N (rs 3804099) w zakresie genu receptora TLR2 jest związany ze stężeniem androstendionu zarówno w grupie kobiet z PCOS jak i bez tego zespołu, co według Autorki potwierdza udział tego receptora w rozwoju hiperandrogenemii u kobiet, niezależnie od PCOS
- - polimorfizm S450S genu TLR2 oraz oba badane polimorfizmy genu TLR4 korelują z wyższym stężeniem stężeniem FSH, co pozwala przypuszczać, że receptory te odgrywają rolę w procesie owulacji u kobiet z PCOS.

W podsumowaniu Doktorantka krytycznie ustosunkowała się do uzyskanych wyników, analizując ograniczenia wykonanych badań.

Przedstawiona do recenzji praca posiada dużą wartość merytoryczną ponieważ dotyczy mało poznanej roli polimorfizmów TLR2 i TLR4 w patogenezie zespołu metabolicznego i zespołu PCO. W piśmiennictwie dostępne są zaledwie dwa badania dotyczące PCOS. Doktorantka wykorzystuje w swojej pracy nowoczesne metody molekularne.

Dlatego też uważam, że uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje i są cennym wkładem w poznanie roli badanych polimorfizmów w rozwoju zaburzeń metabolicznych występujących w PCOS i powinny być opublikowane jak najszybciej.

Praca jest przygotowana bardzo starannie pod względem językowym i graficznym.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na pewne wątpliwości nasuwające się podczas analizy pracy, które powinny być wyjaśnione przed publikacją wyników badania.

- - Uważam, że wniosek 4a (str. 104) *„Obecność allele C w zakresie polimorfizmu S450S TLR2 pełni funkcję ochronną przed rozwojem miażdżycy co wskazuje na udział tego polimorfizmu w procesie aterogenezy”* jest zbyt daleko idący wzięwszy pod uwagę, że korelacja stężenia HDL z występowaniem tego polimorfizmu u pacjentek z PCOS była na granicy znamienności ($p=0,05$), a grupa badana niezbyt liczna ($n=40$).
- - Podobnie wniosek 4b (str. 104) *„Polimorfizm w zakresie genów receptora TLR2 jest związany ze stężeniem androstendionu zarówno w grupie kobiet z PCOS jak i bez tego zespołu. Potwierdza to udział tego receptora w rozwoju hiperandrogenemii u kobiet, niezależnie od PCOS”*. Korelacja polimorfizmu TLR2 N199N (rs3804099) ze stężeniem androstendionu nie była znamienna statystycznie ($p=0,08$) w grupie pacjentek z PCOS, a w pracy nie znalazłam wyników korelacji badanych polimorfizmów z parametrami hormonalnymi czy metabolicznymi grupy kontrolnej.
- - Autorka nie uzasadnia czym kierowała się w wyborze badanych polimorfizmów genów TLR2 i TLR4.
- - W tekście Autorka posługuje się dowolnie oznaczeniami poszczególnych polimorfizmów, co bardzo utrudnia czytanie i zrozumienie tekstu, np. polimorfizm TLR2 N199N (rs3804099), czasem występuje w pełnym brzmieniu, czasem jako N199N, a czasem jako rs3804099.

Praca spełnia całkowicie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, a powyższe uwagi nie wpływają istotnie na ogólną wartość pracy. Oceniam ją bardzo wysoko za ogromny wkład pracy i molekularne podejście do tematu. Wnioskuje do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Akademii Medycznej we Wrocławiu o dopuszczenie Autorki lek. med. Mai Jończyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie Autorki recenzowanej przeze mnie pracy.

Dr hab. n. med. Agata Bałdys-Waligórska

