

Warszawa, 28.08.2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Lekarz Karoliny Stożek


p.t. „Analiza komórek B regulatorowych o fenotypie CD19+CD26hiCD27+IL10+ i CD19+IL-10 we krwi obwodowej oraz ekspresji transportera cynkowego 8 w tkance tarczycowej u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami tarczycy”

Autoimmunizacyjne choroby tarczycy (AIT) w krajach rozwiniętych są najczęstszą przyczyną dysfunkcji tarczycy. Mimo olbrzymiego postępu wiedzy na ich temat, nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Choroba przede wszystkim dotyczy tarczycy, ale pozatarczycowe manifestacje AIT mogą być bardzo poważne i prowadzić do istotnego pogorszenia zdrowia i sprawności chorego. Dotyczy to m.in. orbitopatii tarczycowej, czy encefalopatii towarzyszącej AIT. Początkowo AIT były postrzegane jako choroby pierwotnie rozwijające się w tarczycy, ale rozwój immunologii radykalnie zrewidował ten pogląd. Obecna koncepcja patogenyzy AIT zakłada, że podstawą inicjacji procesu jest dysfunkcja układu immunologicznego, a tarczyca jest głównym narządem docelowym ataku. Według aktualnie obowiązującej teorii na temat przyczyn zainicjowania choroby, najistotniejszą rolę odgrywa predyspozycja genetyczna, a czynniki środowiskowe działają jako czynniki spustowe. Czynniki genetyczne nie podlegają modyfikacji, ale na środowiskowe możemy wpływać, co umożliwia potencjalne działania prewencyjne. Natomiast nowe odkrycia w immunologii pozwalają na opracowanie metod leczenia bliskich działaniu przyczynowemu.

Dlatego ocena zaburzeń w układzie immunologicznym u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami tarczycy i badanie wybranych czynników środowiskowych jest bardzo cenne z punktu widzenia potencjalnego wykorzystania tej wiedzy w terapii. Te aspekty analizowała lek. Karolina Stożek w swojej pracy.

Informacje o recenzowanej Rozprawie Doktorskiej

Rozprawa Lek. Karoliny Stożek ma charakter klasycznej monografii. Ma ona 174 strony. Zawiera 6 tabel i 29 rycin i 11 fotografii. Rozpoczyna ją wykaz stosowanych skrótów, następnie spis treści. Kolejną częścią jest wstęp, w którym autorka przedstawia charakterysty-



kę chorób autoimmunizacyjnych tarczycy (AIT), ich częstość i patogenezę, w tym najbardziej szczegółowo charakterystykę immunologiczną. Autorka przedstawiła dwie podstawowe postaci kliniczne AIT, chorobę Gravesa – Basedowa (GB) i przewlekłe limfocytowe zapalenie tarczycy typu Hashimoto (HT). Następnie lekarz Karolina Stożek opisała limfocyty B i ich rolę w procesie autoimmunizacji. Najbardziej szczegółowo przedstawiła limfocyty B regulatorowe (Breg) i ich właściwości oraz rolę w AIT, uwzględniła również rolę limfocytów T regulatorowych. W dalszej części wstępu lek. Karolina Stożek przedstawiła patogenezę i metody leczenia orbitopatii tarczycowej oraz nowe czynniki wpływające na rozwój chorób autoimmunizacyjnych tarczycy. Wstęp kończy opis aktualnych terapii choroby Gravesa- Basedowa z uwzględnieniem najnowszych koncepcji leczenia.

Po wstępie autorka przedstawiła założenia i cele pracy, następnie opis grupy badanej, opis metod, wyniki, dyskusję i wnioski. Monografię kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz piśmiennictwa, liczący 228 pozycji, po którym umieszczono spis tabel, rycin i fotografii.

Na uznanie zasługuje zrównoważony układ pracy, bo mimo obszerności wstępu autorce udało się zachować równowagę z dyskusją.

Omówienie szczegółowe.

Uwagi do wykazu skrótów:

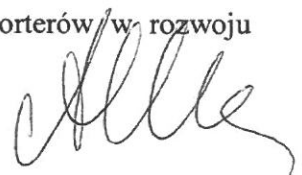
Wykaz stosowanych skrótów powinien być uporządkowany alfabetycznie, co znacznie ułatwiłoby posługiwanie się nim. Poza tym skróty MDSC i MSC są rozwinięte identycznie, co sugeruje, że opisują ten sam parametr, a w rzeczywistości tak nie jest, w podobny sposób użyto tych skrótów w tekście na str. 12. W wykazie skrótów nie należy umieszczać symboli pierwiastków chemicznych, są one powszechnie znane i nie są skrótami *sensu stricto*.

Poza tym w całej pracy autorka stosuje różne skróty dla tego samego określenia: np. AITD, który jest umieszczony w wykazie skrótów i ATD, który pojawia się tylko w tekście a także w tytułach podrozdziałów (str.18).

Ocena wstępu.

Dysertacja lekarz Karoliny Stożek jest bogatym źródłem wiedzy na temat autoimmunizacyjnych chorób tarczycy u dzieci. Przedstawiła w niej najnowsze koncepcje i poglądy na patogenezę AITD, bardzo dokładnie scharakteryzowała limfocyty zaangażowane w proces autoimmunizacji, opisała najnowsze metody terapeutyczne, również te pozostające na razie w fazie prób klinicznych.

Bardzo cenne jest przedstawienie w pracy roli cynku i jego transporterów w rozwoju



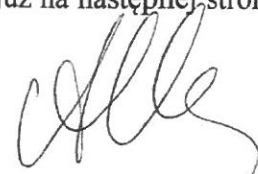
autoimmunizacji. Autorka wnikliwie opisała budowę i czynność transporterów cynku, w tym ZnT8, który został uznany za ważny autoantygen wysp trzustkowych, ale wykazuje ekspresję także w innych tkankach. Lekarka Karolina Stożek włączyła do wstępu dysertacji także dane dotyczące roli mikrobioty jelitowej w rozwoju AIT. Jest to bardzo ciekawy, poparty argumentacją o wysokiej wartości merytorycznej opis oddziaływania mikrobioty na układ immunologiczny, ilustrowany świetnymi rycinami. Autorka bardzo umiejętnie wskazuje na najważniejsze aspekty tej zależności. W tej części na stronie 30 przytoczono niewłaściwą cytację (156) w odniesieniu do mechanizmu działania MMI na ZnT8.

Poza tym we wstępie, jak i w całej pracy autorka stosuje różne określenia: autoimmunizacyjne i autoimmunologiczne choroby tarczycy. Nazwa autoimmunizacyjne choroby tarczycy jest uznana za prawidłową polską nazwę przez immunologów. Jest dopuszczalne stosowanie nazwy „autoimmunologiczne”, ale w pracy naukowej użycie jednej lub drugiej nazwy powinno być konsekwentne. Na str. 17 autorka podaje, że u pacjentów z GB komórki B są dominującą populacją limfocytów. Fakt ten powinien być poparty właściwymi cytacjami. Dalej we wstępie lekarka Karolina Stożek pisze o udziale „Breg w patogenezie AITD i GD”. Choroba Gravesa- Basedowa jest jedną z postaci AITD, więc wyodrębnianie jej przy opisie ogólnej patogenezы AITD nie wydaje się uzasadnione. Na stronie 21, gdzie przywołano wyniki metaanalizy Chen i wsp. brak właściwej cytacji. Autorka pisze, że „orbitopatia jest powikłaniem ograniczającym życie”- należy doprecyzować co miała na myśli w tym sformułowaniu? Czy jakość życia czy skrócenie przeżycia?

Lekarka Karolina Stożek przyjęła następujące **cele pracy**:

1. Ocena odsetka komórek B regulatorowych o fenotypie CD19+CD26hiCD27+IL10+ i CD19+IL-10 oraz CD19+IL-10 (B10) u dzieci z ATD w porównaniu do grupy kontrolnej
2. Wpływ zastosowania leczenia tyreostatykiem (w przypadku nadczynności tarczycy) oraz L-tyroksyną (w przypadku niedoczynności tarczycy) na odsetek komórek Bregs
3. Ocena korelacji wymienionych wyżej subpopulacji komórek Bregs ze stężeniem hormonów i przeciwciał przeciw-tarczycowych
4. Ocena ekspresji ZnT8 w tkance tarczycowej u pacjentów po tyreoidektomii z powodu GB

Autorka używa w pracy dwóch różnych skrótów na określenie choroby Gravesa- Basedowa: GB oraz GD: w części opisującej cele pracy jest skrót GB, a już na następnej stronie



w opisie grupy badanej jest skrót GD, podobnie w wykazie skrótów. Powtarza się to także w niektórych rycinach.

Uwagi do części „Pacjenci i metody”

W pierwszym zdaniu autorka napisała że odwraca się statystyka dotycząca występowania AIT u dorosłych i w populacji dziecięcej, co sugeruje, że AIT u dzieci są obecnie częstsze niż u dorosłych. Czy są dane na ten temat? Jeżeli tak, to powinno to być poparte właściwą cytacją.

Dalej lekarz Karolina Stożek opisuje kryteria doboru grupy badanej.

Początkowo autorka używa określenia „grupa badawcza” w odniesieniu do pacjentów włączonych do analizy. Prawidłowe określenie to „grupa badana”. Grupa badawcza to prawidłowe określenie zespołu badaczy.

Grupy badane powinny być opisane jednolicie, należy podać kryteria według których rozpoznawano zapalenie tarczycy typu Hashimoto i chorobę Gravesa- Basedowa oraz kryteria wdrożenia leczenia lewotyroksyną w HT, a przy MMI średnia dawka leku [mg/kg/d].

Metody laboratoryjne zostały bardzo dokładnie opisane, ponadto zilustrowane przykładowymi wynikami.

Metody zastosowane do analizy statystycznej były właściwie dobrane, Wiek grupy badanej jest opisany średnią i medianą, czy spełniał kryteria rozkładu normalnego?

Pacjenci po operacji wola tarczycy- określenie „wole” jest wystarczające, bo termin ten u człowieka oznacza zawsze tkankę tarczycową. Na stronie 37 podano że pacjenci z GB byli obserwowani przed rozpoczęciem terapii oraz w trakcie jej trwania: 3 miesiące i 1 rok. Bardziej jednoznaczny byłby opis, że u pacjentów z grupy badanej oceniano analizowane parametry przed wprowadzeniem leczenia, po trzech miesiącach i po roku. Istnieje nieścisłość w tekście i w tabeli 1: autorka odwołuje się do danych 53 pacjentów z tab.1, natomiast w wymienionej tabeli jest opis grup badanych o łącznej liczebności 37 pacjentów: 12 z chorobą Gravesa- Basedowa, 10 z chorobą Hashimoto i 15 z grupy kontrolnej.

Tytuł tabeli 3 powinien być zmieniony. Obecnie tytuł tabeli mówi o parametrach klinicznych, a umieszczone w niej dane są parametrami biochemicznymi. Poza tym wartości podane w tabeli sugerują, że badane parametry nie spełniały warunków rozkładu normalnego, więc powinny być raczej przedstawione w postaci mediany i zakresów.



Uwagi do opisu wyników pracy

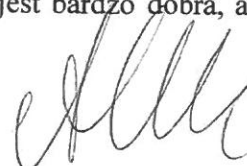
Wyniki są najbardziej obszerną częścią pracy, Są bogato ilustrowane obrazami cytometrii przepływowej oraz fotografiami preparatów tarczycy. Czytający może dzięki temu sam ocenić wyniki opisywane przez autorkę, co jest dodatkowym atutem pracy.

Unikalnym doświadczeniem autorki jest wiedza jakiego rzędu wielkości liczbowe limfocytów Bregs stwierdziła w grupach badanych, jest to bardzo interesujące także dla innych badaczy i moim zdaniem wartości odsetkowe powinny być podane w opisie wyników, a nie tylko przedstawione w postaci wykresów. Następnym nurtującym mnie pytaniem jest jak oceniano spadek produkcji IL10? Czy oceniano ilość IL10, czy raczej stwierdzono zmianę ilości komórek z wewnątrzkomórkową ekspresją IL10, co sugerują rycina 8 i 9. Autorka na str. 59 opisuje, że w punkcie zerowym nie obserwowano różnic w zakresie limfocytów CD19+CD38+ z ekspresją IL10 lub FoxP3, a w kolejnym zdaniu opisuje, że obserwowano spadek poziomu Breg o tym fenotypie u pacjentów z GB. Powinno być zaznaczone w którym punkcie pomiarowym to stwierdzono. W rycinie 12f opisano cechy charakterystyczne limfocytów Breg u pacjentów z grupy kontrolnej (HC), czy z chorobą Hashimoto, bo użyto skrótu HT? Opis ryciny sugeruje, że brano pod uwagę tylko GB i HC. Poza tym w tej rycinie użyto różnych skrótów symbolizujących chorobę Gravesa- Basedowa: G-B i GD, należy to ujednoczyć.

W części opisującej wpływ leczenia tiamazolem na dystrybucję Bregs u pacjentów z GB autorka opisuje wyniki uzyskane po 1-2 latach terapii. Powinno to być ujęte w opisie metod, bo wcześniej podano, że badania wykonywano w punkcie zerowym, po 3 miesiącach terapii i po roku. Bardzo ciekawa i czytelna jest rycina 14 ilustrująca korelacje między Bregs i parametrami funkcji tarczycy.

W monografii pojawiają się kolokwializmy i skróty językowe, które nie powinny być używane w pracy naukowej np. „*Pacjenci z Gravesem -Basedowem* (s.83), „*stężenie fenotypu*” (s.68). Określenie „*fenotyp był obniżony*”, lub „*stężenie fenotypu*” które powtarza się w pracy jest skrótem roboczym. Prawidłowym sformułowaniem jest: „odsetek komórek o fenotypie ...”. W opisie rycin 22 – 24 sformułowanie: „*znaczenie poziomów limfocytów CD4+(...) na przebieg zmian*” należy zastąpić raczej określeniem „wpływ”.

Bardzo ciekawą obserwacją lekarz Karoliny Stożek jest fakt, że ZnT8 ma tak silną ekspresję w komórkach tarczycy i komórkach C oraz w limfocytach naciekających tarczycę. Idea przedstawienia graficznego wyników Western blot dla GAPDH oraz ZnT8 jest bardzo dobra, ale



wykresy rycin 28 i 29 byłyby bardziej czytelne, gdyby były uporządkowane albo według gradacji gęstości (malejąco lub rosnąco), albo według numeru pacjenta.

Głównym osiągnięciem pracy było stwierdzenie, że u dzieci z chorobą Gravesa- Basedowa odsetek limfocytów Breg jest mniejszy niż w grupie kontrolnej zdrowych dzieci, a największa różnica dotyczyła limfocytów B z ekspresją IL-10. U pacjentów z niższym odsetkiem limfocytów B wydzielających IL-10 autorka stwierdziła wyższe stężenia antyTg.

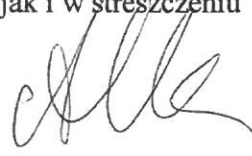
Ciekawą obserwacją lekarz Karoliny Stożek było stwierdzenie, że w trakcie leczenia tyreostaticznego zmiany w Bregs obserwowano już w początkowej fazie leczenia- w tym przypadku po 3 miesiącach. Autorka podkreśla, że nie tylko liczba Bregs ale także ich zdolność wytwarzania IL-10 jest zmniejszona u pacjentów z chorobą Gravesa- Basedowa, co wskazuje, że zaburzenia mają charakter zarówno ilościowy jak i jakościowy.

Dyskusja jest dobrze przeprowadzona, z właściwym doбором piśmiennictwa i zawiera szeroki wachlarz prac z uwzględnieniem najnowszych publikacji. Autorka rozpoczyna dyskusję od analizy ograniczeń które są związane z małą liczebnością i niejednorodnością badanych grup. Świadczy to o dojrzałości naukowca, który potrafi obiektywnie ocenić wyniki swojej pracy, zauważając jej słabe strony i ograniczenia. Lekarz Karolina Stożek ma tę świadomość i potrafi właściwie interpretować wyniki. Swoboda dyskusji z wynikami innych autorów świadczy o rozległej wiedzy autorki, która potrafi analizować skomplikowaną sieć wzajemnych powiązań komórek układu immunologicznego. O swobodzie w poruszaniu się w tym temacie świadczy również fakt, że potrafi przewidywać potencjalne możliwości wykorzystania Breg w terapii AIT, co umieściła w dyskusji.

Przeciwciała dla ZnT8 były początkowo uważane za marker charakterystyczny dla cukrzycy typu 1, ale badania lek. Karoliny Stożek dobitnie udowadniają, że ekspresja ZnT8 jest znaczna w tyreocytach, komórkach C, a także naciekających tarczycę limfocytach. Wykorzystanie równolegle trzech metod doświadczalnych do potwierdzenia obecności ZnT8 jest niepodważalnym dowodem, że nie jest to antygen specyficzny jedynie dla wysp trzustkowych.

Uwagi do wniosków:

Podane wnioski są nadmiernie rozbudowane i zawierają informacje, które powinny być przedstawione raczej w sekcji wyników bądź w dyskusji. Uwaga ta odnosi się do wniosków umieszczonych w monografii, natomiast wnioski umieszczone w streszczeniu pracy są czytelne i doskonale sformułowane. Uważam, że zarówno w monografii jak i w streszczeniu



wnioski powinny brzmieć tak samo.

Moim zdaniem wniosek 3 w streszczeniu, a w monografii 4 powinien być nieco ostrożniej sformułowany, bo w pracy nie oceniano obecności przeciwciał anty ZnT8 u pacjentów, więc pierwsze zdanie wniosku nr 4 (monografia) nie jest uprawnione jako wniosek z przedstawionej analizy.

Uwagi edytorskie i błędy językowe.

W pracy powinno być ujednolicone nazewnictwo i stosowanie jednolitych skrótów, występują też drobne błędy stylistyczne. Dokładne uwagi umieszczono w opisie poszczególnych części pracy.

Główne osiągnięcia pracy.

Dysertacja lek. Karoliny Stożek zasługuje na uznanie z uwagi na bardzo szerokie ujęcie tematu. Dzięki temu jest możliwe powiązanie procesów, w których biorą udział komórki układu immunologicznego z konsekwencjami klinicznymi. Było to trudne i ambitne zadanie, bo wymagało dużej dyscypliny, aby nie zagubić się w szczegółach i zachować równowagę poszczególnych części pracy. Układ monografii jest uporządkowany, czytelny, co świadczy o umiejętności syntetycznego przedstawienia tematu przez lek. Karolinę Stożek. Analiza przeprowadzona przez lek. Karolinę Stożek jest oparta na niewielkiej grupie chorych, co ogranicza wartość uzyskanych wyników. Autorka jednak jest tego w pełni świadoma i podkreśla to w dyskusji, co świadczy o dojrzałym podejściu do interpretacji wyników swoich badań. Lekarka Karolina Stożek opublikowała wiele wartościowych prac na temat zmian układzie immunologicznym u dzieci z AIT, Jej ogromna wiedza w tym zakresie nie pozostawia wątpliwości. Nieliczne błędy stylistyczne i językowe nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji.



Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. Karoliny Stożek

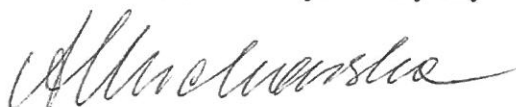
p.t. „Analiza komórek B regulatorowych o fenotypie CD19+CD26hiCD27+IL10+ i CD19+IL-10 we krwi obwodowej oraz ekspresji transportera cynkowego 8 w tkance tarczycowej u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami tarczycy”

spełnia wszystkie kryteria określone art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595) z późn. zmianami (Dz.U. z 2017r poz 1789 oraz art.179 ust. z dnia 3.lipca 2018r oraz poz.1669). Wobec powyższego, zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Karoliny Stożek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Anna M. Kucharska

Klinika Pediatrii i Endokrynologii,

Warszawski Uniwersytet Medyczny



dr hab. n. med.
Anna M. Kucharska
specjalista pediatra, endokrynolog
endokrynolog i diabetolog dziecięcy
2172429