

Gdańsk, 20. 09. 2023 r.

Prof. dr hab. n med. Katarzyna Zorena
Kierownik
Zakład Immunobiologii
i Mikrobiologii Środowiska
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 7
80-211 Gdańsk
Tel. 58 3491766
email:katarzyna.zorena@gumed.edu.pl

RECENZJA

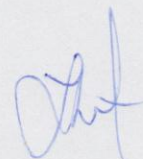
na stopień doktora nauk medycznych pracy pt. *Analiza komórek B regulatorowych o fenotypie CD19+CD24^{hi}CD27+IL-10+ i CD19+IL-10+ we krwi obwodowej oraz ekspresji transportera cynkowego 8 w tkance tarczycowej u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami tarczycy lek Karoliny Stożek*

Promotor : Prof. dr hab. n. med. Artur Tadeusz Bossowski z Kliniki Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii, z Pododdziałem Kardiologii Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska obejmuje łącznie 174 strony w tym: wykaz stosowanych skrótów (str. 3-6), spis treści (str. 7-8), wstęp (str. 9-30), cele pracy (str. 32), materiał i metody (str. 33-50), analiza statystyczna (str. 50-51), wyniki (str. 52- 110), dyskusja (str. 111- 123), wnioski (str. 124-126). Doktoranta zamieściła również streszczenie w języku polskim (str. 127-130) i angielskim (str. 131-134), piśmiennictwo w liczbie 228 pozycje (str. 135-165), wykaz tabel na str. 166, rycin (str. 167-172), oraz fotografii (str. 173-174).

W ostatnich latach obserwuje się rosnący trend zachorowań na schorzenia o podłożu autoimmunizacyjnym w tym autoimmunizacyjne choroby tarczycy (ATD) na czele z przewlekłym zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (HT) oraz chorobą Gravesa- Basedowa (GD) stanowią istotny problem terapeutyczny w grupie pacjentów wieku rozwojowego.

We wstępie przesłanej mi dysertacji lek Karolina Stożek w oparciu o obszerne piśmiennictwa omówiła choroby z zakresu autoimmunizacji. Przedstawiła poznane do tej pory przyczyny



chorób z autoagresji, jak czynniki środowiskowe, predyspozycje genetyczne, jak też dysfunkcje immunologiczne mające wpływ na ryzyko rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Pomimo, wielu badań zarówno na świecie jak też w Polsce zagadnienia nt. czynników modulujących szybkość i natężenie procesu autoimmunizacji, to wciąż istnieje potrzeba znalezienia nowych metod prewencji oraz terapii autoimmunizacyjnej choroby tarczycy.

W ostatnich latach badacze wykazują coraz większe zainteresowanie obecnością komórek B regulatorowych (fenotyp CD19+CD24^{hi}CD27+IL-10+, CD19+IL-10+), które pełnią kluczową rolę w zachowaniu tolerancji i immunologicznej homeostazy. Ta heterogenna grupa limfocytów, działając poprzez mechanizmy bezpośrednie lub za pomocą wydzielanych cytokin i metabolitów, wykazuje właściwości supresyjne. Zauważono, iż liczba i funkcje komórek B regulatorowych (Breg) zmieniają się w różnych chorobach autoimmunizacyjnych.

Ponadto, w świetle ostatnich badań podkreśla się rolę niedoboru cynku w przebiegu wielu procesów immunologicznych, w tym w dojrzewaniu i funkcji limfocytów T i B. Transporter cynku 8 (ZnT8) jako jeden z autoantygenów w cukrzycy typu 1 może być również markerem autoimmunizacji w chorobach tarczycy. Dlatego też, Doktorantka w swoich badaniach, które stanowią dysertację podjęła próbę:

1. Oceny odsetka komórek B regulatorowych o fenotypie CD19+CD24^{hi}CD27+IL-10+ oraz CD19+IL-10+ (B10) u dzieci z ATD w porównaniu do grupy kontrolnej.
2. Wpływu zastosowania leczenia tyreostatykiem (w przypadku nadczynności tarczycy) oraz L-tyroksyną (w przypadku niedoczynności tarczycy) na odsetek komórek Bregs.
3. Oceny korelacji wymienionych wyżej subpopulacji komórek Bregs ze stężeniem hormonów i przeciwciał przeciw-tarczycowych.
4. Oceny ekspresji ZnT8 w tkance tarczycowej u pacjentów po tyreoidektomii z powodu GB.

Materiał i metody:

Na uzyskane badania lek Karolina Stożek uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej nr R-I-002/438/2017 oraz R-I-002/422/2010.

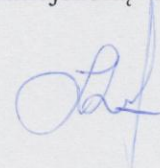
Doktorantka do badań włączyła pacjentów w wieku 5-19 lat ze zdiagnozowaną chorobą autoimmunologiczną tarczycy, będących pod opieką Kliniki Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii, z Pododdziałem Kardiologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku oraz grupę kontrolną składającą się z pacjentów bez żadnych chorób o podłożu

autoimmunologicznym czy też zapalnym, również w historii rodzinnej oraz z ujemnym mianem przeciwciał tarczycowych.

Wśród pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą autoimmunologiczną tarczycy było 12 pacjentów z chorobą Gravesa- Basedowa (n= 12) oraz zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (n= 10). Ponadto w grupie badanej byli pacjenci, u których zastosowano leczenie w tym: z chorobą Gravesa- Basedowa (n=17) było leczonych tiamazolem, natomiast pacjentów z zapaleniem typu Hashimoto, lekiem stosowanym była L-tyroksyna (n=10). Wśród zakwalifikowanych pacjentów przeprowadzono badanie przedmiotowe i podmiotowe, oceny biochemicznej hormonów odpowiedzialnych na prawidłową pracę tarczycy oraz ocenę ultrasonograficznej gruczołu tarczowego. Dodatkowo, aby potwierdzić autoimmunologiczny charakter choroby, wykonano oznaczenie immunoserologiczne określające poziom swoistych autoprzeciwciał: przeciwko peroksydazie tarczycowej (anty-TPO), przeciwko tyreoglobulinie (anty-TG) oraz przeciwko receptorowi dla TSH (anty-TSHR/TRAb). Ponadto, aby określić ekspresje transporterów cynku w tkance tarczycowej zebrano grupę 37 nastoletnich pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (n=20) oraz z nietoksycznym wolem guzkowym (n=17) zakwalifikowanych do częściowej lub kompletnej tyroidektomii, którą przeprowadzono w Klinice Chirurgii Dziecięcej i Transplantologii w Instytucie „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie. Kwalifikacja pacjentów do zabiegu również przebiegała na ocenie parametrów biochemicznych, badań ultrasonograficznych oraz w przypadku wola guzkowego- na scyntygrafii z użyciem I131. Ponadto, materiał po kompletnej bądź częściowej tyroidektomii został utrwalony, a następnie wykorzystany do oceny immunohistochemicznej, immunofluorescencyjnej oraz z wykorzystaniem techniki Western Blot.

Natomiast do oceny częstości występowania poszczególnych populacji limfocytów B regulatorowych u badanych pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy zastosowano cytometrię przepływową. Ocenę Breg wykonywano w trzech punktach czasowych: przy przyjęciu, po 3 i po 12 miesiącach terapii.

Doktorantka w sekcji wyniki wykazała, że u badanych pacjentów (dzieci i młodzieży) wykryto zmniejszoną liczbę komórek B produkujących IL-10 (B10) zarówno w stosunku do limfocytów B, jak i wszystkich limfocytów w każdej badanej grupie, w porównaniu do zdrowej kontroli. Odnotowano spadek produkcji IL-10 przez limfocyty Breg wykazujące się ekspresją CD19+CD24+CD27+IL-10 i CD1d+CD5+CD19+IL-10+ zarówno w nieleczonej i leczonej grupie pacjentów z ATD. Co więcej, w badanej grupie pacjentów odnotowano wyższe poziomy Foxp3+ i IL-10+ Breg z fenotypem CD38(-) i zmniejszoną liczbę



CD38+Foxp3+IL-10+ u dzieci z GD. Ponadto stwierdzono, że wybrane podgrupy Breg istotnie korelują z poziomami TSH i TRAb.

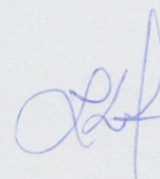
Doktorantka wykazała również znacznie wyższe poziomy komórek efektorowych Th1, Th17 i Th22 u pacjentów z chorobą Gravesa- Basedowa. Wykryła, że Tiamazol nie wpływał istotnie na zmiany w obrębie badanych komórek, z tendencją jedynie do redukcji limfocytów Th22 po 1 roku terapii. W przeciwieństwie do zdrowych osób z grupy kontrolnej, pacjenci z GD wykazali istotne korelacje między badanymi limfocytami Th i Breg tylko w kontekście limfocytów Th1 i Th17. Wdrożenie leczenia tiamazolem wywołało niewielkie, ale statystycznie nieistotne zmiany w tych wzajemnych interakcjach.

W kolejnym etapie badań, Doktorantka wykazała ekspresję transportera ZnT8 w tkankach tarczycy u badanych pacjentów z chorobą GD w stopniu (+++) i NTNG (++) . Ekspresję tę stwierdzono zarówno w komórkach pęcherzykowych tarczycy (w cytoplazmie i błonie cytoplazmatycznej w komórkach pęcherzykowych), jak i komórkach C (reakcja błonowo-cytoplazmatyczna) metodą immunohistochemiczną i immunofluorescencji.

Rzetelnie przeprowadzona dyskusja otrzymanych wyników własnych lek Karoliny Stożek w odniesieniu do wyników innych badaczy w pełni potwierdza umiejętność i dojrzałość naukową Doktorantki.

Na podstawie przeprowadzonych badań lek Karolina Stożek przedstawiła cztery trafne wnioski, które są dowodem na w pełni zrealizowanie celów badań.

1. Przeprowadzone badania pozwoliły na wskazanie nowych aspektów patogenetycznych prowadzących do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych tarczycy u dzieci.
2. Redukcja odsetka limfocytów Breg z fenotypem CD19+CD24+CD27+IL-10+ i CD19+IL-10 odpowiada za zaburzenia tolerancji immunologicznej w przebiegu choroby GD u dzieci. Analiza udziału Breg w przebiegu ATD powinna być skupiona na efektach wywoływanych przez te komórki, a nie na obecności ich konkretnych fenotypów.
3. Obecność ekspresji ZnT8 w tkance tarczycowej pacjentów z GD i NTNG sugeruje potencjalną rolę tego transportera jako kolejnego autoantygeny w patogenezie ATD.
4. Uzyskane wyniki mogą stanowić fundament do dalszych badań nad komórkami immunokompetentnym i autoantygenami oraz wykorzystania ich potencjału w nowych metodach terapii chorób autoimmunizacyjnych.



W streszczeniu przygotowanym w języku polskim i angielskim Doktorantka przedstawiła rzetelnie wszystkie rozdziały rozprawy doktorskiej.

Dobór cytowanego piśmiennictwa z ostatnich 10 lat liczbie 228 nie budzi zastrzeżeń i wskazuje na to, że tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna i nowatorska w świetle obecnych badań. Moją uwagę zwróciły publikacje z pierwszym autorstwem Pani Karliny Stożek, dlatego też chciałam zapytać dlaczego Doktorantka nie zdecydowała się na przygotowanie dysertacji z cyklu publikacji.

Pragnę potwierdzić wysoką jakość naukową oraz wartość kliniczną ocenianej przeze mnie dysertacji, co zapewne jest także wynikiem wieloletniego doświadczenia oraz bardzo dobrego warsztatu naukowego Promotora niniejszej rozprawy doktorskiej- prof. dr hab. n med. Artura Bossowskiego.

Podsumowując - stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny pt. *Analiza komórek B regulatorowych o fenotypie CD19+CD24^{hi}CD27+IL-10+ i CD19+IL-10+ we krwi obwodowej oraz ekspresji transportera cynkowego 8 w tkance tarczycowej u dzieci z autoimmunizacyjnymi chorobami tarczycy* lek Karoliny Stożek **jest pozytywna** i jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego, wykazuje bardzo dobre przygotowanie warsztatu badawczego, jak też umiejętności korzystania z dostępnych badań naukowych. Doktorantka nabyła umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, co odpowiada warunkom określonym w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki tj. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789.) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Jednocześnie, wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie do dalszych etapów rozprawy doktorskiej lek Karolinę Stożek.

Ze względu na nowatorski charakter przeprowadzonych badań, kliniczne zastosowanie uzyskanych wyników wnoszę wniosek do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek Karoliny Stożek.

KIEROWNIK
Zakładu Immunobiologii
i Mikrobiologii Środowiska
prof. dr hab.n.med. Katarzyna Zorena