POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
KLINIKA ENDOKRYNOLOGII,
CHORÓB METABOLICZNYCH
I CHORÓB WEWNĘTRZNYCH
71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1
tel. +48 91 425 3540,41, fax +48 91 425 3542

Szczecin 09.11.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz Marii Kościuszko "Ocena przydatności klinicznej oznaczania interleukin 17 i 23 we krwi pacjentów z chorobą Gravesa i współistniejącą orbitopatią".**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska porusza bardzo ważny z punktu widzenia klinicznego problem orbitopatii tarczycowej w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa. Choroba ta jest najczęstszą przyczyną nadczynności tarczycy na obszarach bez niedoboru jodu. Objawy osiowe choroby Gravesa-Basedowa obejmują: wole, orbitopatię tarczycową, obrzęk przedgoleniowy i akropachię tarczycową. Najczęściej choroba Gravesa-Basedowa przebiega z nadczynnością tarczycy, ale może być także u chorych z niedoczynnością tarczycy lub eutyreozą. Objawy orbitopatii tarczycowej są obecne u ponad 30% chorych, ale postać postępująca choroby wymagająca leczenia występuje u 5-10% chorych, a u 3-5% chorych ma ciężki przebieg. Ocena ciężkości orbitopatii tarczycowej i ocena stopnia jej aktywności opiera na badaniu klinicznym, badaniach obrazowych i badaniach laboratoryjnych. W ocenie klinicznej wykorzystywane są skale CAS, NOSPECS, Bartaleny i inne. W badaniach obrazowych podstawowe znaczenie ma rezonans magnetyczny, na podstawie tego badania można różnicować zmiany naciekowo-obrzękowe tkanek oczodołu od zmian włóknistych, co ma duże znaczenie przy podejmowaniu decyzji o włączeniu leczenia metylprednizolonem u tych chorych. W badaniach laboratoryjnych podstawowe znaczenie, w ocenie ciężkości przebiegu orbitopatii i pozytywnej reakcji na leczenie, ma badanie stężenia przeciwciał przeciwko receptorowi TSH (TSH-Rab, TRAB), który jest podstawowym autoantygenem przeciwko któremu skierowane są reakcje immunologiczne zarówno w gruczole tarczowym jak i w tkankach oczodołu. Dane z piśmiennictwa wskazują, że ocena stężeń w surowicy niektórych interleukin takich jak IL-4 czy IL-10 może mieć istotne znaczenie w prognozowaniu efektów leczenia glikokortykosteroidami orbitopatii tarczycowej. Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej fakty należy uznać, że

temat podjęty przez doktorantkę jest bardzo ciekawym pod względem etiopatogenezy orbitopatii tarczycowej, jak i bardzo istotnym z punktu widzenia klinicznego.

Praca liczy 90 stron maszynopisu, w tym 19 tabeli i 14 rycin, zawiera spis treści, wykaz skrótów oraz zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań. Praca składa się ze standardowych rozdziałów: wstęp, założenia i cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, spis tabel i rycin oraz wykaz skrótów.

Wstęp liczy 35 stron maszynopisu. We wstępie doktorant przedstawia rys historyczny choroby Gravesa-Basedowa, epidemiologię nadczynności tarczycy, aspekty kliniczne choroby Gravesa Basedowa i orbitopatii tarczycowej oraz aspekty etiopatogenetyczne choroby Gravesa-Basedowa i orbitopatii tarczycowej. W rozwoju chorób autoimmunizacyjnych tarczycy odgrywają rolę zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Im wcześniej ujawnia się choroba autoimmunizacyjna tarczycy tym udział czynników genetycznych jest większy. Chodzi głównie o defekt supresorowych limfocytów T swoiście związanych z gruczołem tarczowym i uzyskanie przewagi przez limfocyty pomocnicze, które stymulują limfocyty B odpowiedzialne za powstawanie komórek plazmatycznych produkujących przeciwciała przeciwko głównemu autoantygenowi tarczycowemu, jakim jest receptor TSH. Bardzo istotnym elementem w etiopatogenezie choroby Gravesa-Basedowa jest odsłonięcie na powierzchni tyreocytów antygenów zgodności tkankowej klasy II – HLA-DR3, co nasila reakcję autoimmunologiczną. W etiopatogenezie choroby Gravesa-Basedowa istotną rolę odgrywają także czynniki środowiskowe takie jak nadmierna podaż jodu, czynniki infekcyjne i stres. W rozwoju orbitopatii tarczycowej szczególne znaczenie przypisuje się paleniu papierosów i leczeniu I-131 nadczynności tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa. W ocenie orbitopatii tarczycowej wykorzystuje się badanie kliniczne, w tym badanie okulistyczne, badanie rezonansu magnetycznego oczodołów i badania laboratoryjne. Badanie kliniczne polega na ocenie stopnia wyrównania czynności tarczycy (dążenie do stanu eutyreozy) oraz oceny stopnia aktywności i ciężkości zmian ocznych w oparciu o skale : CAS, NOSPECS, Bartaleny i inne. Badanie NMR pozwala nie tylko wykluczyć proces wypierający w oczodole, co jest szczególnie istotne w wytrzeszczu jednostronnym, ale także pozwala ocenić

stopień aktywności procesu zapalnego w oczodole : zmiany obrzękowo naciekowe czy zwłóknienie. Badania laboratoryjne to głównie testy tarczycowe potwierdzające kliniczną eutyreozę, ale także określenie stężenia w surowicy krwi przeciwciał przeciwko receptorowi TSH (TRAB). Ocena stężeń interleukin w surowicy krwi może mieć duże znaczenie w diagnostyce i leczeniu orbitopatii tarczycowej, ale dane na ten temat są podzielone, a badania mało dostępne w codziennej praktyce endokrynologicznej. Stosowane obecnie leczenie orbitopatii pozwala uzyskać poprawę w 70-80% przypadków. Leczenie orbitopatii w fazie aktywnej polega głównie na stosowaniu dożylnych pulsów metylprednizolonu i radioterapii oczodołów. Chirurgiczna dekompresja oczodołów może być wykonana zarówno w fazie aktywnej jak i nieaktywnej. Jako leki drugiego rzutu wymienia się między innymi cyklosporynę, rytuksymab, mykofenolan mofetylu i analogi somatostatyny. Reasumując wstęp napisany jest dobrze i w sposób logiczny nawiązuje do dalszych części pracy. Drobna uwaga dotyczy ryciny 4, która częściowo jest po polsku (podpis pod ryciną), a częściowo po angielsku (treść ryciny), moim zdaniem całość powinna być w języku polskim.

Cele pracy

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania oznaczeń krążących w surowicy stężeń IL-17 i IL-23 jako markerów aktywności orbitopatii Gravesa. Ponadto podjęto próbę oceny ich roli w patogenezie choroby i leczeniu GO u pacjentów poddanych leczeniu GKS. Zdaniem recenzenta, dla większej przejrzystości, cele pracy powinny być podane w punktach.

Kolejny rozdział – materiał i metody liczy 9 stron maszynopisu. Badania przeprowadzono w trzech grupach. Grupa pierwsza składała się z 15 pacjentów, w tym 13 kobiet i 2 mężczyzn (średnia wieku 47 lat), z GO zakwalifikowanych do leczenia dożylnymi pulsami metylprednizolonu. Grupa druga obejmowała 10 pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa bez współistniejącej GO, w tym 7 kobiet i 3 mężczyzn (średnia wieku 51 lat). Trzecia grupa (grupa kontrolna) obejmowała 10 zdrowych ochotników, w tym 7 kobiet i 3 mężczyzn (średnia wieku 58 lat). Po uzyskaniu zgody lokalnej Komisji Bioetycznej wykonywano badanie kliniczne z zastosowaniem skali CAS i Bartaleny, badanie obrazowe oczodołów przy pomocy NMR oraz badania biochemiczne z oznaczaniem testów tarczycowych, TRAB, IL-17 i IL-23. Wykonywano także podstawowe

badania biochemiczne: morfologia krwi z rozmazem, stężenie glukozy, Alat, Aspat, CRP, bilirubiny całkowitej, elektrolitów (Na i K) oraz badanie ogólne moczu. U pacjentów z GO przez 6 tygodni stosowano wlewy dożylne z metylprednizolonu (MP) 500mg dziennie, a przez kolejne 6 tygodni 250mg dziennie. Próbki krwi celem oznaczenia TRAB, IL-17 i IL-23 pobrano przed pierwszą dawką MP, po 6 i 12 tygodniach leczenia oraz po upływie 3 miesięcy od zakończenia terapii. Badanie NMR oczodołów wykonywano przed i po zakończeniu leczenia. Badania poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testu u Manna-Whitney'a dla prób niezależnych oraz testu Kruskala-Wallis'a dla prób powiązanych. Ta część pracy napisana jest prawidłowo, pewne zastrzeżenia może budzić brak dokładnego opisu badań w grupie z chorobą G-B bez GO i w grupie kontrolnej.

Wyniki

Wyniki badań zostały przedstawione na 12 stronach maszynopisu. Wyniki uzyskane przez doktorantkę są dobrze udokumentowane i zilustrowane. Wykazano, że wskaźnik CAS ulega istotnemu zmniejszeniu w całej grupie z GO po leczeniu MP. Analizując wielkość redukcji wskaźnika CAS podzielono grupę badanych na tych u których CAS zmniejszył się przynajmniej o 2 punkty (grupa responders=11 chorych) i tych u których poprawa była poniżej 2 punktów (grupa nonresponders=4 chorych). W grupie responders zarówno w zakresie OP jak i OL stwierdzono istotne zmniejszenie wytrzeszczu po leczeniu MP, podczas gdy w grupie nonresponders nie obserwowano istotnej poprawy. W grupie responders w NMR obserwowano istotne zmniejszenie grubości mięśnia prostego dolnego w OP i OL, a w grupie nonresponders tylko w zakresie OL. Leczenie MP w całej grupie GO spowodowało istotne obniżenie stężeń TRAB. Nie obserwowano istotnych różnic stężeń TRAB pomiędzy grupami responders i nonresponders. Wykazano istotną ujemną korelację pomiędzy stężeniem TRAB w surowicy na poszczególnych etapach leczenia oraz grubością mięśnia prostego bocznego OL. Wykazano istotną różnicę wartości oznaczeń IL-23 pomiędzy grupą z GO a grupą kontrolną. Ponadto wykazano różnicę na granicy istotności statystycznej pomiędzy grupą chorych z G-B bez GO a grupą kontrolną. Zaobserwowano istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem w surowicy TRAB i IL-23 po 4500 mg MP. W grupie pacjentów z GO stwierdzono istotną ujemną korelację pomiędzy stężeniami w surowicy IL-17 po

3000mg MP i stężeniem TRAB wyjściowo i po 3000mg MP. W badanej grupie wykazano istotną korelację pomiędzy stężeniem w surowicy IL-17 po 3 miesiącach od zakończenia terapii MP i wartością CAS przed leczeniem. Wyniki opisane są prawidłowo. Jedynie niedokładnie jest podpisana tabela 16.

Dyskusja wyników obejmuje 7 stron maszynopisu, jest dość krótka chociażby w stosunku do długiego wstępu. Część danych zawartych we wstępie można by było umieścić w dyskusji. Jednakże doktorantka sprawnie wykorzystuje dostępne piśmiennictwo do przeanalizowania uzyskanych wyników badań w odniesieniu do innych autorów. Doktorantka podzieliła dyskusję na część dotyczącą oceny klinicznej aktywności GO, w drugiej części odnosi się do badań okulistycznych i obrazowych, a w trzeciej do badań biochemicznych. Skala CAS jest podstawowym, rekomendowanym przez EUGOGO, narzędziem klinicznym do oceny aktywności GO. Rozpoznanie aktywnej postaci GO (CAS co najmniej 3 punkty) jest podstawowym warunkiem przed rozpoczęciem terapii MP niezależnie od czasu trwania objawów ze strony narządu wzroku. Jednakże skala CAS nie zawsze stanowi w pełni miarodajne odzwierciedlenie rzeczywistej aktywności stanu zapalnego w oczodołach, co może mieć miejsce w przypadku zwłóknienia tkanek oczodołu. W diagnostyce GO i ocenie efektów leczenia MP orbitopatii tarczycowej bardzo duże znaczenie ma pomiar wytrzeszczu za pomocą oftalmometru Hertla i ocena grubości mięśni okoruchowych w badaniu NMR. Badania te pomagają w ocenie aktywności procesu zapalnego w oczodołach oraz są podstawą monitorowania skuteczności leczenia GO. Wśród badań biochemicznych podstawowe znaczenie ma nadal badanie stężeń TRAB w surowicy zarówno wyjściowo jak i w trakcie leczenia. Wysokie stężenia TRAB w surowicy są niezależnym od palenia papierosów niekorzystnym czynnikiem rokowniczym przebiegu GO. Badania własne doktorantki wykazały także potencjalne korzyści z określania wartości stężeń w surowicy IL-17 i IL-23. Przeprowadzona analiza może wskazywać na przydatność badania stężenia w surowicy IL-23 jako potencjalnego markera aktywności procesu autoimmunizacyjnego, a oznaczanie IL-17 jako markera nasilenia procesu włóknienia tkanek pozagałkowych w przebiegu orbitopatii tarczycowej.

W wyniku przeprowadzonych badań doktorantka wyciągnęła 4 wnioski, które mają oparcie w wykonanych badaniach:

1. Wskaźnik CAS nie jest w pełni zadawalającym predykatorem efektu leczenia immunosupresyjnego u chorych z GO, co powinno skłaniać do poszukiwania innych użytecznych klinicznie markerów aktywności procesu autoimmunizacyjnego.
2. Ocena grubości mięśni okoruchowych w badaniu MR oraz stopnia wytrzeszczu metodą Hertla przed jak i po zakończeniu leczenia immunosupresyjnego w GO jest przydatną metodą oceny wyjściowej aktywności choroby oraz efektu zastosowanego leczenia.
3. Stężenie IL-23 może, obok TSH-Rab, służyć jako wykładnik aktywności choroby oraz czynnik prognostyczny odpowiedzi na leczenie immunosupresyjne w GO. Stężenie IL-17 może znaleźć zastosowanie jako marker włóknienia, którego nasilenie dyskwalifikuje z terapii immunosupresantami. Obserwacje te wymagają jednak potwierdzenia badaniami z udziałem większej grupy pacjentów z GO.
4. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę układu IL-23/IL-17 w patogenezie orbitopatii w przebiegu choroby Gravesa.

Streszczenie w języku polskim i angielskim nie budzi zastrzeżeń.

Piśmiennictwo zawiera 145 pozycji na 13 stronach maszynopisu z lat 1825-2019r. Przeważają pozycje z ostatnich lat. Piśmiennictwo jest prawidłowo cytowane.

Podsumowanie: przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wszelkie wymogi rozprawy na stopień doktora nauk medycznych, przeto wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lekarz Marii Kościuszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Kliniki Endokrynologii, Chorób Metabolicznych i Chorób Wewnętrznych
prof. dr hab. n. med. Michali Syrenicz