

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Joanny Luty

pt. Wpływ selenu na funkcjonowanie układu odpornościowego u pacjentów z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy

Rozprawa doktorska przedłożona przez mgr Justynę Joannę Luty pochodzi z Zakładu Patologii i Reumatologii Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Wśród czynników etiopatogenetycznych autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy (AITD) wymienia się niedobory selenu. W badaniach eksperymentalnych niedostateczną ilość selenu w organizmie powiązano z niekorzystnym wpływem na układ immunologiczny. Z drugiej strony zbyt wysoka podaż selenu tłumiała odpowiedź immunologiczną, czy też przyczyniała się do rozwoju cukrzycy typu 2. Autorka dysertacji zajmując się wpływem selenu na status tyreologiczny wpisuje się w olbrzymie zainteresowanie endokrynologów tym zagadnieniem i realizuje zapotrzebowanie na tego typu analizę. Wielkie w tym temacie są oczekiwania różnych środowisk, a pytanie czy są one uzasadnione jest wciąż aktualne. Wiele też tu nadinterpretacji wyników badań i spekulacji, a niewiele twardych dowodów naukowych. Zmierzenie się z aspektem patofizjologicznym udziału selenu w patomechanizmie AITD jest więc sporym wyzwaniem, dlatego opracowany przez Doktorantkę projekt badawczy świadczy o Jej odwadze naukowej.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 108 stron i została podzielona na klasyczne rozdziały stosowane w tego typu opracowaniach.

Rozpoczyna ją strona tytułowa. Tytuł w jasny sposób oddaje ogólny cel jaki postawiła sobie Autorka dysertacji.

Po stronie tytułowej następują interesujące w treści podziękowania, w pierwszej kolejności kierowane do Promotora – Profesor Ewy Bryl.

Spis treści (2 strona) jest czytelny i stanowi odzwierciedlenie podziału rozprawy na rozdziały.

Wykaz stosowanych skrótów zajmuje 2 strony. Wykaz ten jest przejrzysty, a zastosowane skróty są właściwe i nieprzypadkowe co ułatwia czytanie rozprawy. Wyjaśnienia skrótów podano w języku polskim i w języku angielskim. W dużej części zawarte w Wykazie skróty powstały z pełnej nazwy w języku angielskim. Do poprawienia drobne błędy literowe.

Wstęp obejmuje 27 stron, zawiera też 2 ryciny, w tym jedną autorską (co warto podkreślić) z *Cytokine*. Wstęp jest interesujący, a w części klinicznej również praktycznie użyteczny, jest dobrze przemyślany, a po jego przeczytaniu łatwo zrozumieć, że stanowi pełne uzasadnienie dysertacji. Wywody i przemyślenia Autorki prezentowane w tym rozdziale są ułożone logicznie i konsekwentnie prowadzą do założeń i celów pracy. We wprowadzeniu Autorka omawia etiopatogenezę i obraz kliniczny AITD. Rozdział o roli wybranych elementów układu immunologicznego w patofizjologii AITD ma walory artykułu szkoleniowego – Autorka trudny temat przedstawia w sposób zrozumiały i interesujący, co wskazuje na jej umiejętności dydaktyczne. Z kolei rozdział o selenie jest w istocie wartościową pracą przeglądową. W nim zainteresowała mnie rycina 2. Wynika z niej, że w Europie, niedobór selenu jest największy m. in. w Polsce, Litwie, Łotwie, Estonii, wschodnich Niemczech i północnej Ukrainie, a w największej ilości w środowisku selen występuje głównie na atlantyckich wybrzeżach kontynentu tj. w Norwegii, Irlandii, Wielkiej Brytanii, Bretanii. Interesująca jest również informacja, że tarczycę cechuje specyficzny wychwyt lub mechanizm retencji selenu, nawet w warunkach jego poważnego niedoboru. Czy wynika z tego, że w AITD ewentualne stosowanie selenu mogłoby być jedynie okresowe? Wielu lekarzy stosuje selen w AITD, czego dowodzą wyniki ankiet wśród nich przeprowadzonych, pomimo braku twardych dowodów naukowych potwierdzających, że jest to korzystne. W odniesieniu do udziału selenu w patogenezie AITD doceniam rozdział w którym Autorka poddaje krytyce poglądy środowiska medycznego na ten temat. Powyższe opisy istotnie wzmacniają uzasadnienie przeprowadzenia badań. Czytając Wstęp szybko uświadomiłem sobie, że Autorkę cechuje dbałość o język i edycję tekstu. Jej język naukowy jest profesjonalny.

Nie mogę jednak zgodzić się z zastosowanym przez Autorkę ujęciem subklinicznej niedoczynności tarczycy. Na str. 9 napisała „... częstość występowania subklinicznej formy tego schorzenia (tj. obecności przeciwciał przeciwtarczycowych u osób w stanie eutyreozy)

...”. Subkliniczna niedoczynność tarczycy nie jest eutyreozą, jest subkliniczną niedoczynnością. Istnieje ściśle określona definicja subklinicznej niedoczynności tarczycy – jest to sytuacja gdy surowicze stężenia fT4 i fT3 są w zakresie referencyjnym, a TSH jest podwyższone. Obraz kliniczny jest skąpoobjawowy, a nawet bezobjawowy, choć należy jednak tę bezobjawowość poddawać w wątpliwość gdyż w subklinicznej niedoczynności tarczycy większe jest przykładowo prawdopodobieństwo reakcji depresyjnych, dyslipidemia nas w ogóle nie dziwi, a wzrost ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca jest dobrze udokumentowany. W subklinicznej niedoczynności tarczycy pojawia się też wiele innych zmian narządowych, które na tym etapie nie są odczuwane przez chorych. Przypuszczam więc, że Autorce chodziło o to, że osoby takie są często bezobjawowe w obrazie klinicznym co nazwała eutyreozą. Choroba Hashimoto w stadium eutyreozy jest sytuacją w której obecności przeciwciał przeciwtarczycowych nie towarzyszą zaburzenia hormonalne (TSH, fT4, fT3 są normie).

W kilku miejscach dysertacji Autorka pisze, że niska zawartość jodu w diecie koreluje z niższą zachorowalnością na chorobę Hashimoto. To oczywiście jest prawda, ale nie mogę oprzeć się wrażeniu, że taki opis należy opatrzyć jednoznacznym komentarzem. Nie chciałbym by ktokolwiek odniósł wrażenie, że Autorka wyznaje zasadę, że wzbogacanie żywności w jod jest niewłaściwe. Wzbogacanie żywności w jod na obszarach z niedoborem jodu jest niezaprzeczalnym sukcesem medycyny i epidemiologii - poprzez zmianę profilu zachorowania na choroby tarczycy zmniejszono konsekwencje niedoboru jodu (np. częstość występowania guzkowej choroby tarczycy), a wśród pacjentów tyreologicznych większy jest odsetek tych z łagodnie przebiegającą chorobą Hashimoto, najczęściej nie wymagającą leczenia. Jednoznaczne zajęcie przez Doktorantkę stanowiska w tej sprawie pozwoliłoby czytelnikowi Jej przyszłych publikacji na analizowanie patogenezy AITD bez podświadomego dyskredytowania suplementacji żywności jodem.

Ponadto, w zdaniu (str. 9) „...10-15% pacjentów z AITD nie posiada krążących przeciwciał” należy dopisać „... takich przeciwciał ...” czyli jak wynika z tekstu anty-TPO i anty-Tg. Przeciwciała te są wykorzystywane w diagnostyce choroby Hashimoto gdyż występują w niej najczęściej a ich czułość diagnostyczna jest znana i wysoka, nie oznacza to jednak, że są jedynymi przeciwciałami powstającymi w chorobie Hashimoto. Powtarzane określenie, że pacjenci „cierpią na chorobę Hashimoto” uważam za przesadzone choć nie brak mi (tak sądzę) empatii w stosunku do tych chorych. Zachowałbym tu proporcję w stosunku do innych chorób pomimo, że odczucie cierpienia może być względne. Na str. 14 zamiast „wzrost przeciwciał” powinno być „wzrost ilości przeciwciał” lub „pojawienie się

przeciwciał”. Na str. 14, mam wątpliwości czy powinno się pisać „ ... spożywających zwiększoną ilość jodu.” gdyż istotą suplementacji jest wyrównywanie niedoborów, w tym wypadku jodu. Z drugiej strony wiadomo, że w konkretnych przypadkach skutkujących właśnie rozwojem AITD, nawet taka ilość jodu może być ponadfizjologiczna – jest to jednak cena za uniknięcie skutków niedoboru jodu w skali globalnej. Na str. 16 zamiast „chorób tarczycy” powinno być „autoimmunologicznych chorób tarczycy”. Do poprawienia drobne błędy literowe i edycyjne.

Doktorantka do nadrzędnych celów dysertacji zaliczyła określenie zależności między stężeniem selenu a odsetkiem limfocytów T regulatorowych u pacjentek z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy, oraz wpływ selenu na markery uszkodzenia i niedoczynności tarczycy (anty-TPO, anty-TG, TSH, fT4 i fT3). Dodatkowo zbadała stężenie selenu w surowicy krwi obwodowej u pacjentek z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy na terenie Trójmiasta, wpływ suplementacji selenu na tempo jego wzrostu w surowicy krwi u tych kobiet oraz dokonała analizy dostępnej literatury pod kątem bezpieczeństwa jego długotrwałego stosowania. Rozdziały Wstęp i Cele pracy dowodzą, że temat dysertacji doktorskiej mgr Justynę Joannę Luty jest nowatorski i ambitny, dotyczy aktualnego zagadnienia.

Rozdział Materiał i Metodyka ma typowy układ, 10 stron i zawarto w nim 2 tabele i 2 ryciny. Opis metodologii był dla mnie zrozumiały. Doktorantka przebieg badania podzieliła na etapy. Jestem pełen uznania dla jej metodycznego podejścia do eksperymentu np. do badania wybrała suplement, w którym zawartość selenu była najbardziej zbliżona do deklarowanej przez producenta. Oznaczeń dokonała z użyciem nie budzących zastrzeżeń nowoczesnych technik analitycznych. Zgromadzony materiał opracowała statystycznie prawidłowo stosując testy odpowiednie do tego typu opracowań. Materiał kliniczny był właściwie dobrany dla realizacji celów zamierzonej pracy. W przyszłości, przy przygotowywaniu artykułu do publikacji proponuję bardziej szczegółowo opisać kryteria włączenia. Z charakterystyki pacjentek wynika, że do badania włączono osoby z AITD, stosujące tyroksynę, znajdujące się w eutyreozie. Przypuszczam, że do badania włączono osoby z AITD, z niedoczynnością tarczycy, co najmniej subkliniczną, stosujące L-tyroksynę i będące w związku z tym w eutyreozie. A jeśli tak nie było i L-tyroksyna została, z jakiegoś powodu, wprowadzona pacjentom z AITD, którzy nie mieli niedoczynności tarczycy należałoby to zaznaczyć. Powyższe czyni jednak pewną różnicę patofizjologiczną gdyż udokumentowanie niedoczynności tarczycy w AITD to dowód na to, że uszkodzenie tkanki hormonalnie czynnej jest większego stopnia. Niedoczynność tarczycy u osób z AITD

rozpoznaje się gdy surowicze stężenia fT4, fT3 są niskie a TSH wysokie (hipotyreoza jawna) czy też fT4, fT3 są jeszcze w normie a TSH wysokie (hipotyreoza subkliniczna), a u osób stosujących już L-T4 gdy w pewnym momencie monitoringu TSH przekroczy górny zakres referencyjny. Należałoby też w przyszłości, w opisie, doprecyzować ilość pobranej krwi gdyż w załączniku nr 1 jest informacja dla pacjentów, że będzie im pobrana krew w ilości 2 razy po 30 ml, ale w Metodyce, jedynie w rozdziale 3.5 o „Analizie subpopulacji limfocytów w krwi pełnej” znalazłem informację o pobraniu 4 ml krwi. Owe 4 ml pobrano, tak sędzę, dla potrzeb analizy subpopulacji limfocytów (jednorazowej?). W Metodyce podano natomiast informację o ilości probówek do których pobierano krew. Z mniej istotnych spostrzeżeń, wprowadzić skrót PBMC jest powszechnie stosowany, ale inne powszechnie stosowane skróty wprowadzono do indeksu więc ten też mógłby się tam znaleźć.

Rozdział Wyniki (18 stron) zawiera 7 tabel i 13 rycin, które wpleciono w tekst. Rozdział ten precyzyjnie opisany - zawiera dużą ilość obserwacji statystycznych i porównań. Tę część pracy również oceniam wysoko – jest logiczna, zrozumiała, a wcześniej dobrze zostały udokumentowane jej podstawy. Doceniam rozdział podsumowanie wyników. Komentarz: „Wszystkie badane parametry laboratoryjne i immunologiczne pomiędzy grupą suplementującą selen oraz grupą otrzymującą placebo nie różniły się statystycznie istotnie między sobą w punkcie początkowym projektu. W przypadku osób przyjmujących placebo również wszystkie badane parametry laboratoryjne i immunologiczne nie różniły się statystycznie istotnie między sobą w punkcie początkowym jak i w punkcie końcowym, czyli po trzech miesiącach przyjmowania placebo. Z tego też powodu w wynikach pracy nie ujęto tych danych.” I tak jest właściwie, choć zastanawiałem się trochę czy nie warto, w tak dużym, co do zasady, opracowaniu jak monografia w przewodzie doktorskim, takich danych zamieścić, choćby w celu ich archiwizacji. Odnośnie tytułów tabel. Powinny być jasne i zawierać istotne treści. W przyszłości w tytule zamiast „krwi obwodowej żyłnej” pisałbym „we krwi”. W tytułach tabel 7-8 może warto napisać po prostu „Porównanie wyników badań ... w grupie ... przed i po 3 miesięcznej suplementacji Se. Użycie tu określenia „pomiędzy pacjentkami” sugeruje porównanie z inną grupą osób. Z kolei określenie „przed badaniem” oznacza w istocie „przed suplementacją”. Na str. 51 napisano „Nie wykazano negatywnego wpływu suplementacji selenem na ” co może sugerować pewne nastawienie badacza do suplementacji. Stwierdzenie „nie wykazano wpływu ...” byłoby bardziej obiektywne. Na str. 52 Autorka pisze, że w fazie lutealnej dochodzi do dramatycznej redukcji odsetka Treg. Proponowałbym nie dramatyzować z powodu tego, jak rozumiem fizjologicznego, zjawiska. Do poprawienia drobne błędy literowe i edycyjne.

Dyskusja obejmuje 12 stron. Trzonem dyskusji jest wyczerpujący przegląd piśmiennictwa. Tak obszerna i rzeczowa dyskusja dowodzi szerokiej i rzetelnej wiedzy Doktorantki dotyczącej poruszanych zagadnień, umiejętności wykorzystania aktualnych danych z piśmiennictwa jak również umiejętności krytycznego rozpatrywania argumentów przemawiających za wnioskami. Jej przemyślenia są równie interesujące. Już na samym początku Dyskusji Autorka skupia się na bezpieczeństwie stosowania suplementów zawierających ten pierwiastek. To bardzo rozsądne, z uwagi na współczesny stosunek do suplementów diety w Polsce. Autorka dyskutuje w sposób bardzo otwarty, przytacza szereg interesujących publikacji, w których opisywano wyniki w jakimś stopniu być może zaskakujące. Czytając Dyskusję kilkakrotnie zwracałem uwagę na to, że Doktorantka bierze pod uwagę praktyczne zastosowanie wyników swoich badań w medycynie. W przyszłości do poprawienia drobne błędy literowe.

Proponowane wnioski w liczbie 5 znajdują oparcie w całości wywodów Doktorantki. Doktorantka dowiodła, że: 1. Suplementacja selenu wykazuje potencjalnie korzystny wpływ na liczbę i odsetek limfocytów CD3⁺ oraz T regulatorowych. 2. Suplementacja selenu nie wykazuje ani pozytywnego ani negatywnego wpływu na markery uszkodzenia i niedoczynności tarczycy (anty-TPO, anty-TG, TSH, fT4 i fT3). 3. Osoby z AITD mieszkające na terenie Trójmiasta nie wykazują niedoborów selenu. 4. Suplementacja selenu (selenometionina) w dawce 200 µg/dobę przez trzy miesiące znacząco podniosła jego stężenie w surowicy, osiągając poziom znacząco przekraczający normę (188 µg/l). 5. Rynek suplementów zawierających selen wymaga regulacji i wprowadzenia konkretnych wytycznych dla osób w różnym wieku oraz stanie fizjologicznym czy chorobowym.

Piśmiennictwo, w większości anglojęzyczne, nie pomijające jednak istotnych doniesień polskich składa się z 262 pozycji ułożonych w porządku cytowania. Dobór piśmiennictwa potwierdza wnikliwą analizę tematu badawczego przez Doktorantkę i jest dużym walorem dysertacji. Piśmiennictwo jest w większości precyzyjnie pod względem edycji i w aspekcie bibliograficznym napisane. W przyszłości, przy przygotowywaniu artykułów do wysłania do redakcji czasopism doradzałbym zastosowanie się do wytycznych dla autorów gdyż Autorka zachowuje czasem nieakceptowaną w większości redakcji dowolność w tym zakresie, na przykład raz podaje skróty tytułów czasopism, a innym razem już nie, i dotyczy to nawet tych samych tytułów. W poz. 225 podano liczne nazwiska autorów. Czy w pozycji 60. podano właściwe dane bibliograficzne publikacji? Poz. 257 to: Hou PF, Zhu LJ, Chen XY, Qiu ZQ. Age-related changes in CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells and their relationship with lung cancer. PLoS One. 2017 Mar 2;12(3):e0173048. doi:

10.1371/journal.pone.0173048. Warto podkreślić, że niektóre z publikacji pochodzą z ośrodka Promotora dysertacji, a Doktorantka jest pierwszą autorką w artykule opublikowanym w renomowanym *Cytokine*. Zmartwiłem się tym, że wśród 262 cytowanych artykułów nie znalazłem ani jednego z Endokrynologii Polskiej – czasopisma Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego. EP publikowała artykuły zarówno nt. selenu jak i np. udziału limfocytów Th17 w AITD. Do poprawienia edycja tekstu w pojedynczych miejscach (dotyczy kropek, dwukropek i zbytecznych spacji).

Dysertacja zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim (po 2 strony).

Do dysertacji dołączono 2 załączniki z podaniem ich nazwy/tytułu. W informacji dla pacjenta powinno być „regulatorowych”, a w zakresach referencyjnych brakuje „µg/l” przy selenie.

Rozprawę doktorską czytałem z przyjemnością i dość szybko uświadomiłem sobie, że jej Autorkę cechuje zarówno dbałość o język jak i o zawartość merytoryczną publikacji. Pod względem edycyjnym rozprawa jest opracowana bardzo starannie. Zauważone przez mnie drobne błędy literowe i edycyjne są w tak dużych opracowaniach trudne do uniknięcia.

Przechodząc do zbiorczej oceny rozprawy doktorskiej przedłożonej przez mgr Justynę Joannę Luty stwierdzić trzeba, że dysertacja ta dotyczy zagadnienia aktualnego, ważnego i interesującego nie tylko ze względów poznawczych, lecz także – może nawet przede wszystkim ze względów praktycznych, klinicznie użytecznych. Dyscyplina zajmująca się sposobami oznaczania i różnicowania istniejących subpopulacji limfocytów T regulatorowych jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się gałęzi immunologii. Doktorantka wpisując się więc w najnowsze trendy badawcze poszerza nasz pogląd na temat udziału selenu w funkcjonowaniu układu odpornościowego u pacjentów z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy. Uzyskane przez Nią wyniki badań wprowadzają element nowości i skłaniają do przemyślenia postępowania u pacjentów z autoimmunizacyjną chorobą tarczycy.

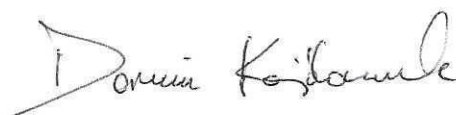
Oceniana rozprawa wskazuje na bardzo dobrą ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie prowadzonych badań, a także dowodzi umiejętności prowadzenia pracy badawczej. Zebrany materiał jest wystarczający dla należytego udokumentowania wniosków a metodyka postępowania badawczego jest dobrana właściwie oraz precyzyjnie opisana. Powyższe spostrzeżenia i uwagi recenzenta w żadnym wypadku nie podważają znaczenia uzyskanych wyników. Autorkę cechuje umiejętność właściwego postawienia problemu badawczego oraz

poprawnego jego rozwiązania w granicach określonych celem badań, a oceniana rozprawa nosi cechy samodzielnego dorobku naukowo-badawczego.

Zdaniem Recenzenta zakres prowadzonych badań, rzetelność ich wykonania i udokumentowania, ich pracochłonność a nade wszystko kliniczna wartość merytoryczna uzyskanych wyników uzasadniają wystąpienie do Rady Nauk Medycznych o wyróżnienie pracy.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.).

Zgłaszam przeto do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Justyny Joanny Luty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dorota Kojanek