

Łódź, 2019-05-22

Dr hab. n. med. prof. nadzw. UM Adam Gesing
Zakład Endokrynologii Starzenia
Katedra Endokrynologii Onkologicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej magister Małgorzaty Tomczyńskiej

Tytuł pracy:

„Mechanizmy nadreaktywności płytek krwi
w chorobach tarczycy o podłożu autoimmunologicznym”

Choroby tarczycy należą do najczęściej występujących chorób układu endokrynnego. Wśród jednostek chorobowych związanych z gruczołem tarczowym, bardzo istotne znaczenie mają choroby o podłożu autoimmunologicznym, do których zalicza się chorobę Gravesa-Basedowa (będącą jedną z najistotniejszych przyczyn nadczynności tarczycy) oraz przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy zwane chorobą Hashimoto, które z kolei jest jedną z najważniejszych przyczyn niedoczynności tarczycy. Warto podkreślić, iż choroby autoimmunologiczne stanowią bardzo różnorodną grupę chorób, a ich wspólną cechą jest autoagresywne działanie układu immunologicznego ukierunkowane na komórki i tkanki własnego organizmu. Niestety, w ostatnich latach, obserwuje się wyraźny wzrost częstości występowania chorób z autoagresji. Z kolei wiadomo, iż w procesach immunologicznych ważną rolę komórek efektorowych mogą pełnić płytki krwi, które również mogą uczestniczyć w reakcjach zapalnych, wchodząc w interakcje z komórkami układu immunologicznego. A zatem, badania podjęte przez Doktorantkę dotyczące wyjaśnienia przyczyn zaburzeń czynności (nadreaktywności) płytek krwi w chorobie Gravesa-Basedowa i chorobie Hashimoto uważam za w pełni zasadne i celowe.

Przedłożony mi do recenzji tekst pracy zawarty na 175 stronach został przygotowany w starannej edycji komputerowej i składa się z 2 głównych części: **Części teoretycznej** obejmującej 5 rozdziałów oraz **Części doświadczalnej** składającej się z 10 rozdziałów (obie części i ich rozdziały wraz z odpowiednimi podrozdziałami i z zachowaną oddzielną numeracją dla **Części teoretycznej i doświadczalnej**). Przyznam jednak, iż nie jest dla mnie

do końca jasne dlaczego np. **rozdział 9 („Piśmiennictwo”)** i **rozdział 10 („Dorobek naukowy”)** są włączone do **Części doświadczalnej** rozprawy, co sugeruje numeracja tych rozdziałów.

Na początku rozprawy, Magister Małgorzata Tomczyńska zawarła „**Spis treści**”, a następnie „**Wykaz skrótów**”. W wykazie tym – zapewne przez pomyłkę edytorską – Doktorantka błędnie rozwinęła skrót PMPs (powinno być ‘mikrocząstki płytkowe’).

W **Części teoretycznej** składającej się z 5 rozdziałów, Autorka w interesujący sposób (z wykorzystaniem m.in. czytelnych schematów i tabel) scharakteryzowała choroby autoimmunologiczne tarczycy wraz z ich etiopatogenezą oraz znaczenie procesów autoimmunizacyjnych i zapalnych w patofizjologii chorób autoimmunologicznych tarczycy. Ponadto, we wspomnianej części pracy, Doktorantka opisała płytki krwi, mechanizmy ich aktywacji oraz rolę płytek krwi jako modulatorów aktywności komórek układu immunologicznego, a także udział tych morfotycznych elementów krwi w patomechanizmach związanych z chorobami autoimmunologicznymi gruczołu tarczowego. W tym miejscu chciałbym jedynie przypomnieć, iż oba płaty boczne tarczycy połączone są strukturą anatomiczną zwaną cieśnią (strona 14, rozdział 1, wers 3).

Dwa pierwsze rozdziały **Części doświadczalnej**, tj. **rozdział 1 („Uzasadnienie podjęcia tematu”)** i **rozdział 2 („Cel pracy”)** są napisane w sposób przejrzysty i nie budzą zastrzeżeń.

W **rozdziale 3** zatytułowanym: „**Materiał i metody**”, Doktorantka m.in. charakteryzuje grupy osób poddanych badaniu (a więc pacjentów z rozpoznaną chorobą Gravesa-Basedowa, pacjentów z chorobą Hashimoto oraz zdrowe osoby stanowiące grupę kontrolną), zastosowane w pracy rodzaje odczynników i ich producentów oraz metody izolacji materiału badawczego (np. izolowanie osocza ubogo- i bogatopłytkowego oraz kożuszka leukocytarno-płytkowego z pełnej krwi, a także izolowanie płytek krwi z osocza bogatopłytkowego). W dalszej części omawianego rozdziału, Autorka w bardzo szczegółowy sposób opisuje poszczególne metody stosowane w niniejszej pracy (m.in. izolowanie fibrynogenu z osocza metodą Doolittle’a, oznaczanie stężenia białka metodą kolorymetryczną czy ocenę poziomu markerów stresu oksydacyjnego i stresu nitracyjnego). Ponadto, Mgr Małgorzata Tomczyńska równie starannie charakteryzuje metody służące ocenie stanu czynnościowego płytek krwi i limfocytów (m.in. pomiar adhezji płytek krwi do kolagenu typu I i fibrynogenu, pomiar agregacji płytek metodą turbidymetryczną czy oznaczenie stężenia rozpuszczalnej formy P-selektyny i CD40L w osoczu).

Chciałbym jednak zwrócić uwagę na następujące elementy pracy odnoszące się do rozdziału „**Material i metody**”, które – moim zdaniem – powinny zostać przedyskutowane:

- Na stronie 54 w rozdziale 3 (podrozdział 3.1), Autorka charakteryzuje grupy pacjentów zakwalifikowanych do badania, informując m.in., iż ocena stanu czynnościowego tarczycy i – szerzej – osi przysadkowo-tarczycowej była oparta o stężenia hormonów: TSH, T3 i T4. Domyślam się, że Doktorantka powyższą ocenę przeprowadzała w oparciu o stężenie wolnych frakcji T3 i T4 czyli fT3 i fT4. Całkowite frakcje T3 i T4 nie są już praktycznie stosowane w rutynowej praktyce laboratoryjnej, gdyż nieraz prowadziły do błędnych wniosków diagnostycznych;
- Ponadto, w tym samym rozdziale i podrozdziale, przydałaby się informacja (np. w formie tabeli) szczegółowo przedstawiająca średnią wraz z odchyleniem standardowym oraz ewentualnie medianę wieku osób zakwalifikowanych do poszczególnych grup poddanych badaniu; podobne informacje (średnia +/- SD, mediana i zakres wartości) mogłyby również dotyczyć stężeń hormonów (TSH, fT3, fT4), w oparciu o które oceniano stan tyreometaboliczny badanych osób. Także liczebność badanych grup powinna być dodatkowo (poza opisami do poszczególnych rycin) zawarta w tej części rozprawy;
- Jednym z kryteriów, które były wykorzystywane przez Doktorantkę przy kwalifikowania pacjentów do grup badanych (choroba Gravesa-Basedowa i choroba Hashimoto) było badanie USG tarczycy (Autorka pisze m.in.: „Pacjenci, u których w oparciu o wywiad kliniczny, badania hormonalne..., miano przeciwciał... i badanie USG tarczycy... stwierdzono...”). Magister Małgorzata Tomczyńska stosuje tu spójnik ‘i’, co sugeruje, iż każdy z pacjentów zakwalifikowanych do badania – z rozpoznaną chorobą Gravesa-Basedowa i chorobą Hashimoto – miał charakterystyczne dla tych jednostek chorobowych zmiany w badaniu USG. Czy Doktorantka może opisać te zmiany? A co w przypadku gdy w badaniu ultrasonograficznym brak było jednoznacznie charakterystycznych zmian typowych dla chorób autoimmunologicznych tarczycy przy jednocześnie występujących nieprawidłowych stężeniach hormonów i podwyższonych poziomach przeciwciał przeciwtarczycowych? Czy tacy pacjenci byli eliminowani z badania? Można domniemywać, iż wynik badania USG tarczycy nie był jednak badaniem rozstrzygającym w kwestii kwalifikowania poszczególnych osób do badania. Wydaje się zatem, iż w zdaniu tym powinien być chyba zastosowany spójnik rozłączny ‘lub’ (ewentualnie konstrukcja ‘i/lub’).

„Wyniki”, które stanowią **rozdział 4** rozprawy, przedstawione zostały w klarowny sposób na 24 rycinach. Na dodatkowej rycinie w tym rozdziale został przedstawiony schemat obrazujący metodę izolacji komórek PBMC na sorterze magnetycznym MASC.

- Na stronie **110** w rozdziale **4**, Autorka przedstawiła wyniki badań dotyczących oceny adhezji niestymulowanych płytek krwi (oraz stymulowanych trombiną) do fibrynogenu i kolagenu typu I u osób z grupy kontrolnej i pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa. Dlaczego analiza tych parametrów nie została także przedstawiona dla pacjentów z chorobą Hashimoto?
- Podobnie, na stronie **123** i **124** w rozdziale **4**, Doktorantka nie umieściła wyników badań odnoszących się – odpowiednio – do oceny odsetka subpopulacji limfocytów krwi obwodowej oraz poziomu migracji komórek PBMC do wyizolowanych płytek krwi u pacjentów z chorobą Hashimoto. Czy Autorka może wyjaśnić jaka jest tego przyczyna?

Uzyskane przez Mgr Małgorzatę Tomczyńską wyniki zostały w interesujący i dojrzały sposób przedyskutowane w **rozdziale 5** („Dyskusja”) z wykorzystaniem bogatego piśmiennictwa.

W **rozdziale 6** zatytułowanym: „**Podsumowanie wyników i wnioski**”, Doktorantka przedstawiła w sześciu podpunktach podsumowanie uzyskanych przez Nią wyników oraz zawarła dwa wnioski ogólne. Generalnie, podsumowanie wyników i same wnioski nie budzą zastrzeżeń.

- Niemniej jednak prosiłbym Mgr Małgorzatę Tomczyńską o wyjaśnienie jednego ze stwierdzeń zawartych w pierwszym punkcie podsumowania wyników. Otóż Autorka pisze w następujący sposób: „Płytki krwi pochodzące od pacjentów z HT i GD wykazują zwiększony poziom aktywacji oraz wyższą reaktywność w odpowiedzi na działanie fizjologicznych agonistów, co wskazuje na kluczowe znaczenie procesów zapalnych i autoagresji, a nie zaburzeń hormonalnych, dla obserwowanych zmian czynnościowych w układzie hemostazy”. Chciałbym zatem zapytać dlaczego zmiany stężeń hormonów osi przysadkowo-tarczycowej mają nie mieć znaczenia w tym aspekcie? Na jakiej podstawie możemy wysnuć takie stwierdzenie? Zresztą proponowałbym Doktorantce jako kontynuację tych bardzo interesujących badań, przeprowadzenie analizy wybranych parametrów dotyczących oceny stanu czynnościowego płytek krwi u osób z podwyższonym poziomem przeciwciał przeciw-tarczycowych i jednocześnie pozostających w stanie eutyreozy, który to stan charakteryzuje się prawidłowymi stężeniami hormonów: TSH, fT3 i fT4 (nie

wynikającymi z prowadzonego leczenia farmakologicznego). W takim modelu w ewidentny sposób eliminujemy potencjalny wpływ na badane parametry nieprawidłowych stężeń hormonów osi przysadkowo-tarczycowej.

„**Streszczenie**” w języku polskim (**rozdział 7**) i w języku angielskim (**rozdział 8**) jest napisane w sposób, który nie budzi zastrzeżeń.

„**Piśmiennictwo**” (**rozdział 9**) zawiera blisko 280 pozycji literaturowych polsko- i anglojęzycznych. Dobór piśmiennictwa jest poprawny i świadczy o szerokiej znajomości przez Doktorantkę literatury z zagadnień stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

- Na stronie **170**, w pracy autorstwa Walkowiaka i wsp. – rok opublikowania tej pracy to rok 1989. Z kolei, na stronie **171**, w pracy Yuna i wsp., niezbędne jest uzupełnienie pełnego tytułu pracy wraz z informacją o roku opublikowania, tytule czasopisma, numerze tomu i zakresie stron tej pracy. Ponadto, dwukrotnie została wpisana praca autorstwa Iddah i Maharia z roku 2013.

Ostatni rozdział rozprawy, tj. **rozdział 10 („Dorobek naukowy”)** zawiera spis publikacji oraz doniesień konferencyjnych ze współautorstwem Doktorantki.

W całej pracy znajdują się ponadto pojedyncze błędy literowe, które jednak w żadnym stopniu nie umniejszają wartości rozprawy.

Podsumowując, pragnę podkreślić, iż bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską Magister Małgorzaty Tomczyńskiej m.in. ze względu na wielość zastosowanych metod badawczych, dużą oryginalność uzyskanych wyników badań i istotny wkład w szczegółowe poznanie mechanizmów związanych z nadreaktywnością płytek krwi u chorych z chorobami tarczycy o podłożu autoimmunologicznym. Badania te zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone, uzyskane wyniki w dojrzały sposób przedyskutowane, a przedstawione wnioski mogą być przydatne w codziennej praktyce klinicznej.

W związku z powyższym, zwracam się z uprzejmym wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Magister Małgorzaty Tomczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, uwzględniając – wspomnianą już wyżej przeze mnie – dużą oryginalność uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z wnioskiem o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Zakładu Endokrynologii Starzenia
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
A. Gesing
Dr hab. n. med. prof. nadzw. Adam Gesing