



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Klinika Otolaryngologii

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a, 15 - 276 Białystok

tel: (085) 831 82 69, e-mail: otol@umb.edu.pl

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. med. Marek Rogowski

Białystok, 20.10.2021

Dr hab. n. med. Andrzej Sieśkiewicz
Klinika Otolaryngologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Recenzja

**rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne mgr Dominiki Łachety
pt. „Immunologiczne aspekty orbitopatii Graves’a „**

Promotor: dr hab. n. med. Mirosław Szczepański
Katedra i Zakład Biochemii Wydział Lekarski Warszawski Uniwersytet Medyczny

Choroba Gravesa-Basedowa (GD, Graves disease) występuje nierzadko, bo z częstością średnio ok. 20-50 nowych przypadków na 100000 na rok. Charakteryzuje się niezwykle złożonym mechanizmem rozwoju, na który składają się czynniki genetyczne, immunologiczne i środowiskowe. Orbitopatia Gravesa (GO, Graves orbitopathy) jest jednym z pozataarczycowych objawów GD, który rozwija się mniej więcej u połowy chorych. U podłoża orbitopatii leżą zaburzenia immunologiczne polegające na pojawieniu się autoprzeciwciał skierowanych przeciwko wspólnym antygenom w obrębie gruczołu tarczowego i tkanek oczodołowych. Przeciwciała, łącząc się z autoantygenami w obrębie oczodołu, uruchamiają kaskadę reakcji zapalnych prowadzących do nacieku komórek immunologicznych, produkcji cytokin, chemokin, czynników wzrostu, aktywacji fibroblastów, stymulacji produkcji macierzy pozakomórkowej, adipogenezy i miofibrylogenezy. Konsekwencją tych wielokierunkowych procesów zapalnych jest ekspansja i przebudowa tkanek oczodołowych klinicznie objawiająca się wytrzeszczem, podwójnym widzeniem, zaburzeniem widzenia barw i pogorszeniem ostrości widzenia.

Pomimo coraz lepszego poznania procesów immunologicznych odpowiedzialnych za rozwój GO wciąż dalecy jesteśmy od pełnego zrozumienia ich wzajemnych zależności, czego dowodem jest brak precyzyjnego i skutecznego leczenia farmakologicznego. O istotności problemu świadczy fakt, że badania patogenezy GD i poszukiwanie nowych sposobów terapii tej choroby w ostatnich latach są tematem ponad 100 publikacji indeksowanych w bazie literaturowej PUBMED rocznie.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Dominiki Łachety pt. „Immunologiczne aspekty orbitopatii Graves’a” dotyczy zatem tematu jak najbardziej aktualnego i istotnego zarówno w aspekcie badań naukowych jak i praktyki klinicznej.

Układ przedstawionej do recenzji rozprawy jest typowy dla nowego typu prac doktorskich i składa się z cyklu monotematycznych wcześniej publikowanych i recenzowanych prac:

1. Łacheta D, Miśkiewicz P, Głuszko A, Nowicka G, Struga M, Kantor I, Poślednik KB, Mirza S, Szczepański MJ. Immunological Aspects of Graves' Ophthalmopathy. *Biomed Res Int.* 2019 Nov 12;2019:7453260. doi: 10.1155/2019/7453260. PMID: 31781640; PMCID: PMC6875285.
2. Łacheta D, Poślednik KB, Czerwaty K, Ludwig N, Molińska-Glura M, Kantor I, Jabłońska-Pawlak A, Miśkiewicz P, Głuszko A, Stopa Z, Brzost J, Szczepański MJ. RAGE and HMGB1 Expression in Orbital Tissue Microenvironment in Graves'

Pierwsza z tych publikacji to praca przeglądowa, poszerzająca wiedzę w obszarze tematycznym objętym badaniami kolejnej pracy, która powstała w oparciu o oryginalne badania własne. W obu przypadkach mgr Dominika Łacheta jest pierwszym autorem, a łączna punktacja przedstawionych publikacji wynosi IF 6,034; MNiSW 170. Wkład doktorantki w kolejne prace to odpowiednio 40% i 45%.

Na całość rozprawy poza przedstawionymi publikacjami składają się: informacja o źródle finansowania, wstęp, założenia i cel pracy, podsumowanie i wnioski, a także stosowne zgody Komisji Bioetycznej, oświadczenia współautorów publikacji oraz spis literatury.

Praca napisana jest językiem poprawnym, bez błędów stylistycznych i uchybień edytorskich. Umieszczenie na początku rozprawy wykazu skrótów ułatwia analizę prezentowanych treści i podążanie tropem myślowym autora.

We wstępie przedstawiono w zrozumiały sposób złożoną etiopatogenezę choroby Gravesa-Basedowa i towarzyszącej jej orbitopatii. Autorka w zrozumiały sposób opisuje mechanizmy immunologiczne odpowiedzialne za rozwój orbitopatii bazując często na najnowszych doniesieniach literaturowych, co w przypadku immunologii ma szczególne znaczenie ze względu na dynamiczny rozwój w ostatnich latach tej dziedziny nauk medycznych. W rozdziale tym znajdziemy również informacje na temat wieloligandowego receptora produktów zaawansowanej glikacji (receptor for advanced glycation end products, RAGE) oraz białka grupy wysokiej mobilności 1 (high mobility group box 1, HMGB1) oraz ich udziału w procesie zapalnym w mechanizmie odporności wrodzonej i nabytej.

Następnie w sposób logiczny, na podstawie analizy danych literaturowych, wskazujących na kluczową rolę układu odpornościowego w przewlekłych chorobach o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym, autorka przechodzi do sformułowania hipotezy, że oś RAGE/HMGB1 uczestniczy w patogenezie GO, a nasilenie ekspresji tych białek może korelować ze stanem klinicznym pacjentów z GO.

W kolejnym rozdziale kandydatka jasno określa cele pracy które mają dać nowe odpowiedzi i poprzeć stawianą hipotezę.

Cele pracy to:

1. Ocena roli układu immunologicznego w etiologii i patogenezie GO.
2. Określenie znaczenia klinicznego ekspresji RAGE i HMGB1 w mikrośrodowisku tkanki tłuszczowej oczodołów w GO.

Przedstawione założenia i cele pracy wskazują na spójny i przemyślany plan naukowo-badawczy.

Następnie doktorantka zamieszcza publikacje składające się na rozprawę doktorską. Należy podkreślić, że chociaż są to jedynie dwie publikacje, to opublikowanie wyników oryginalnych badań własnych czy przeglądowych, analizujących dostępną w danej dziedzinie literaturę, w renomowanych wysoko punktowanych czasopismach naukowych i recenzowanych przez międzynarodowy panel recenzentów, świadczy o ich istotności i dużej wartości merytorycznej.

W pracy przeglądowej opisano szczegółowo procesy immunologiczne biorące udział w rozwoju orbitopatii towarzyszącej chorobie Gravesa-Basedowa. Zwrócono szczególną uwagę na rolę fibroblastów oczodołowych i udział autoantygenów w patogenezie GO wskazując na potencjalne cele terapeutyczne mogące mieć znaczenie w opracowywaniu nowych metod leczenia choroby. Na uwagę zasługuje również przedstawienie w pracy danych z własnych, niepublikowanych wcześniej badań immunohistochemicznych tkanek oczodołowych pacjentów z GO, sugerujących zaangażowanie TGF β (transformujący czynnik wzrostu β ; ang. transforming growth factor β), TLR4 (receptory Toll-podobne, ang. Toll-like receptors), HIF-1 α (czynnik indukowany hipoksją 1 α ; ang. hypoxia-inducible factor-1 α), NF- κ B (czynnik jądrowy kappa B, ang. nuclear factor kappa B) i interleukiny 17 (IL-17) w rozwój stanu zapalnego, hipoksji i procesów włóknienia.

Uważam, że praca ta, ze względu na staranność analizy dostępnej literatury i omówienie problemów terapeutycznych pacjentów z GO stanowiła dobrą bazę do zaplanowania badań własnych autorki.

W pracy badawczej autorka oceniała ekspresję białek znanych z udziału w przewlekłych procesach zapalnych - receptora RAGE i jego ligandu HMGB1, w tkance oczodołowej pacjentów z GO. Zarówno kwalifikacja pacjentów do grupy badanej i kontrolnej jak i wybór metody badawczej nie budzi zastrzeżeń. Wręcz przeciwnie, należy pochwalić autorkę za pionierskie wykorzystanie badań immunohistochemicznych w ocenie ekspresji RAGE i HMGB1 w tkance oczodołowej.

Grupę badaną stanowiło 23 pacjentów co w świetle badań statystycznych nie jest grupą bardzo liczną, szczególnie gdy planowana jest analiza porównawcza pacjentów z różnym stopniem zaawansowania klinicznego choroby (w tym przypadku obecność lub nieobecność neuropatii nerwu wzrokowego (dysthyroid optic neuropathy, DON)). Należy jednak zaznaczyć, że tkanka oczodołowa jest materiałem badawczym bardzo unikatowym,

dostępnym tylko w nielicznych ośrodkach specjalizujących się w chirurgicznym leczeniu GO i posiadających dostęp do banków tkanek.

Wyniki pracy badawczej zostały zaprezentowane w sposób szczegółowy i zrozumiały, a ich zobrazowanie w formie wykresów, poparte zdjęciami z badań immunohistochemicznych, świadczy o rzetelności autorki. Analiza zebranych w pracy danych wykazała istotną statystycznie różnicę ekspresji RAGE i HMGB1 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną (odpowiednio, $p=0,001$ dla RAGE i $p=0,02$ dla HMGB1) co potwierdziło sformułowaną na wstępie hipotezę, że oś RAGE/HMGB1 uczestniczy w patogenezie GO. Co prawda korelacja ekspresji tych białek ze stanem klinicznym pacjentów (obecność DON) osiągnęła wartość graniczną znamienności statystycznej $p=0,05$, tym niemniej należy zachować ostrożność w formułowaniu wniosków ostatecznych o istnieniu takiej zależności, biorąc pod uwagę małą liczebność grup badanych – co stanowi moją uwagę krytyczną.

Oceniając tę pracę w całości stwierdzam jednak, że jej zawartość merytoryczna jest wysoka i zawiera ona bardzo cenne analizy o dużej przydatności klinicznej.

Rozprawę doktorską wieńczy krótkie podsumowanie uzyskanych wyników. Przeprowadzone przez doktorantkę badania po raz pierwszy oceniły ekspresję RAGE i HMGB1 metodą immunohistochemiczną na unikalnym materiale biologicznym jakim jest tkanka tłuszczowa oczodołów. W pracy po raz pierwszy również wykazano obecność komórek nacieków zapalnych RAGE- i HMGB1- dodatnich, zlokalizowanych blisko naczyń, a także stwierdzono statystycznie istotną różnicę w ekspresji tych białek u chorych z GO i pacjentów zdrowych, wskazując na ich potencjalny udział w rozwoju procesu zapalnego w orbitopatii tarczycowej.

Przedstawione wnioski są logiczne i są pochodną uzyskanych wyników, a co równie istotne odpowiadają postawionym na początku pracy celom badawczym.

Pracę uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim, które przedstawione zostały w sposób zwięzły i komunikatywny, umożliwiając szybkie zapoznanie się z najważniejszymi aspektami pracy doktorskiej.

Dobór bibliografii jest trafny i przemyślany, świadczy o doskonałej znajomości najnowszych doniesień i umiejętności trafnego ich wykorzystywania.

Ogólna ocena rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Łachety pt. „Immunologiczne aspekty orbitopatii Graves’a „ jest pozytywna. Praca wpisuje się w nurt badań pogłębiających naszą wiedzę na temat udziału procesów immunologicznych w patomechanizmie orbitopatii

Gravesa, co jest szczególnie istotne z punktu widzenia opracowywania i rozwoju nowych metod terapii, a także poprawy możliwości monitorowania aktywności choroby.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska jako całość spełnia warunki określone w art.13 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn.zm.) w związku z art.179 ust. 1 z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz.1669 z późn. zm.). Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. n. med. Andrzej Sieńkiewicz