

## Ocena

### rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Zembskiej

#### Rola białka TRAIL i jego wybranych receptorów oraz polimorfizm genu TNFRSF 10A w chorobach autoimmunologicznych tarczycy

Rozprawa doktorska przedłożona przez mgr Agnieszkę Zembską pochodzi z Katedry i Kliniki Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, placówki znanej i cenionej nie tylko z powodu wysokiego profesjonalizmu w zakresie leczenia chorób gruczołów dokrewnych, ale również z powodu prowadzenia szeroko zakrojonych wielokierunkowych badań dotyczących różnych aspektów endokrynologii, w tym tyreologii.

Autoimmunizacyjne choroby tarczycy (AITD) to obecnie najczęstsze zaburzenia o podłożu autoimmunologicznym. W populacji chorych przeważają zapalenie tarczycy typu Hashimoto oraz choroba Gravesa – Basedowa. Najogólniej można stwierdzić, że u tych chorych występuje niekompetentna odpowiedź układu odpornościowego skierowana przeciwko własnym tkankom, której towarzyszy przewlekły stan zapalny. AITDs są zaliczane do chorób o złożonej etiologii, ponieważ zaburzenia te rozwijają się w wyniku interakcji między wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Co ciekawe, czynnikiem ryzyka wystąpienia procesów autoimmunologicznych może być również wadliwie działający proces apoptozy, zaprogramowanej śmierci komórki. Ostatnio pojawia się coraz więcej informacji dotyczących roli białka TRAIL w procesie apoptozy w chorobach autoimmunologicznych, w tym w chorobach tarczycy. Jednocześnie, dysponujemy wiedzą, że prawie 80% udziału w rozwoju oraz progresji AITD mają czynniki genetyczne, w tym jak się zdaje, mutacje i polimorfizmy genów związanych z funkcją układu odpornościowego.

Aktualne doniesienia naukowe potwierdzają udział apoptozy w chorobach autoimmunizacyjnych tarczycy, jednak rola rozpuszczalnej formy białka TRAIL i jego receptorów w procesie zaprogramowanej śmierci komórki nie jest do końca poznana w tych schorzeniach. Połączenie się białka TRAIL z jego receptorami śmierci, a więc z receptorem DR4 i DR5 prowadzi do pobudzenia sygnału prowadzącego do aktywacji szlaku apoptotycznego. Zaobserwowano, że zwiększone stężenie białka TRAIL występuje w chorobie Gravesa i Basedowa, natomiast mniejsze w chorobie Hashimoto. Nie dysponujemy jednak żadnymi doniesieniami, które wskazywałyby na istnienie związku między polimorfizmem genu *TNFRSF10A* kodującego receptor DR4 z występowaniem choroby autoimmunizacyjnej tarczycy.

Tematyka pracy, której podjęła się Doktorantka jest więc niezwykle aktualna i interesująca, ambitna i trudna, skupia się bowiem na ocenie zależności stężeń białka sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2, OPG oraz częstości występowania alleli polimorfizmów genu *TNFRSF10A* u osób z chorobami autoimmunologicznymi tarczycy oraz wśród osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma charakter monografii liczącej 124 strony. Rozprawa zawiera klasyczne rozdziały (części) stosowane w tego typu opracowaniach. Rozpoczyna ją strona tytułowa. Tytuł powinien być krótki, zwięzły i treściwy i taki właśnie jest. Zaraz po tytule Doktorantka wymienia Recenzentów, nie zapomniała też o podziękowaniach skierowanych do Pana Promotora, osób zaangażowanych w powstanie rozprawy doktorskiej a także do członków najbliższej Rodziny, co jest bardzo miłe. Na początku monografii znajdujemy spis treści, wykaz skrótów, spis tabel oraz rycin. W rozbudowanym wprowadzeniu znajdujemy dokładne analizy kliniczne zapalenia tarczycy Hashimoto oraz choroby Gravesa i Basedowa. Jest to rzetelny i nowoczesny opis jednostek chorobowych, który ma niewątpliwie walor dydaktyczny. Kolejne zajmujące fragmenty wstępu to opis różnych aspektów biochemicznych i klinicznych białka TRAIL, szeroki opis zjawiska apoptozy i jej znaczenia a także krótkie rozważania na temat ewentualnego znaczenia polimorfizmu genu *TNFRSF10A*.

W następnej kolejności Autorka precyzyjnie przedstawiła założenia, o których już wspomniałem wcześniej, oraz 5 dokładnych celów pracy.

Materiał i metody opisane są również precyzyjnie i przejrzysto. Grupę badaną stanowili pacjenci z chorobą autoimmunizacyjną tarczycy w wieku 20-81 lat, głównie kobiety. W celu dokładnej analizy wpływu białka sTRAIL i badanych polimorfizmów genetycznych na występowanie AITD grupę badaną podzielono na dwie podgrupy: z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto oraz z chorobą Gravesa i Basedowa przy uwzględnieniu słusznie przyjętych przez Autorkę kryteriów włączenia. Grupę kontrolną stanowiły osoby w wieku 30-78 lat. Kryteriami włączenia do grupy kontrolnej był stan pacjentów w eutyreozy klinicznej i hormonalnej, bez wola i z ujemnymi przeciwciałami przeciwtarczycowymi. Natomiast kryteriami wyłączenia pacjentów zarówno z grup badanych, jak i kontrolnej były: cukrzyca, przewlekła choroba zapalna lub układowa, niedawna lub aktualna choroba infekcyjna, brak zgody na badania. U wszystkich pacjentów na podstawie dokumentacji medycznej analizowane były wyniki badań laboratoryjnych oraz dane kliniczne, takie jak: wiek, wzrost, masa ciała, wskaźnik masy ciała. Projekt badania uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (zgoda nr KB 528/2018), badanie przeprowadzono zgodnie z deklaracją Helsińską.

Doktorantka w części metodycznej opisuje dokładnie metody analiz laboratoryjnych parametrów gospodarki węglowodanowej, gospodarki lipidowej, TSH, hormonów tarczycy, przeciwciał przeciwtarczycowych, metody oceny stężeń białek sTRAIL, sTRAIL-R1, sTRAIL-R2, OPG oraz metody identyfikacji polimorfizmów genu *TNFRSF10A*.

Według Recenzenta zebrany materiał jest wystarczający dla należytego udokumentowania wyników i wniosków a metodyka postępowania badawczego jest dobrana właściwie oraz precyzyjnie opisana.

Zgromadzony materiał opracowano statystycznie prawidłowo stosując nowoczesne testy, odpowiednie do tego typu opracowań.

Analizę statystyczną otrzymanych w pracy wyników badań przeprowadzono w pakiecie statystycznym R (wersja 4.0). Otrzymane wyniki zostały przedstawione w tabelach lub/i na wykresach z podaniem wartości średniej, odchylenia standardowego ( $\pm$ SD), mediany, przedziału kwartylowego (kwartył pierwszy, kwartył trzeci). Analizę statystyczną przeprowadzono z dwóch niezależnych powtórzeń eksperymentu. Cechy ilościowe w przypadku dwóch grup zostały porównane za pomocą testu U Manna Whitneya, a w przypadku trzech grup zastosowano analizę wariancji ANOVA z analizą post hoc metodą Tukeya (*Aligned ranks transformation ANOVA, ART ANOVA*). W celu porównania cech jakościowych w badanych grupach wykorzystano test Fishera. Test Spearmana zastosowano do analizy istniejących korelacji. W wykorzystanych w analizie statystycznej testach za minimalny poziom istotności przyjęto  $p < 0,05$ . Równowaga Hardy'ego-Weinberga została zweryfikowana za pomocą testu chi-kwadrat i poprzez oszacowanie oczekiwanych częstości genotypu na podstawie kwadratu dwumianu dla tych polimorfizmów.

Wyniki badań zostały przedstawione przejrzysto, ujęte w 21 rycinach i 38 tabelach.

Podsumowując je, okazało się, że w chorobie Gravesa oraz w chorobie Hashimoto występują istotnie większe stężenia sTRAIL niż u zdrowych osób. Pacjenci z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto wykazywali znacząco większe stężenia sTRAIL-R1 w porównaniu do pacjentów z chorobą Gravesa oraz osób z grupy kontrolnej.

Badania wykazały też, że większe stężenie białka OPG występują u ludzi starszych z chorobą Gravesa, a większym stężeniom OPG towarzyszy również mniejsze stężenie insuliny. W tej grupie stwierdzono także, że im większe stężenie białek sTRAIL i sTRAIL-R1 tym mniejsze stężenia TSH oraz większe  $fT_3$ . Z kolei u pacjentów otyłych z zapaleniem Hashimoto wykazano większe stężenia sTRAIL i sTRAIL-R1. Osoby z tej grupy z podwyższonym stężeniem trójglicerydów również prezentowały większe stężenia białka sTRAIL, a podwyższonemu mianu przeciwciał anti-TPO towarzyszyły mniejsze stężenia sTRAIL-R2 i większe OPG.

Analiza korelacji pomiędzy polimorfizmem rs6557634 a stężeniem cholesterolu całkowitego i frakcją cholesterolu LDL wykazała, że większe stężenia cholesterolu całkowitego i LDL występują u homozygot GG z grupy GD oraz u homozygot AA z grupy HT.

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że w grupie choroby Gravesa głównie nosiciele genotypu GA w polimorfizmie rs6557634 prezentowali znacząco mniejsze stężenie TSH, a w grupie HT homozygoty AA charakteryzowały się większymi wartościami TSH. W grupie Gravesa heterozygoty GA i homozygoty AA miały większe stężenia  $fT_3$  i  $fT_4$ , natomiast w grupie Hashimoto homozygoty AA prezentowały mniejsze stężenia obu hormonów tarczycy.

Wariant polimorficzny GA w grupie z chorobą Hashimoto charakteryzował się istotnie największym mianem anty-TG w stosunku do genotypów GG i AA oraz względem grup z chorobą Gravesa i grupy kontrolnej. W grupie Gravesa homozygoty AA prezentowały statystycznie większe wartości TRAb w porównaniu do grupy Hashimoto i grupy kontrolnej.

Obszerna i rzeczowa dyskusja przeprowadzonych badań dowodzi szerokiej i rzetelnej wiedzy Doktorantki dotyczącej poruszanych zagadnień, umiejętności wykorzystania aktualnych danych z piśmiennictwa, jak również umiejętności krytycznego rozpatrywania argumentów przemawiających za wnioskami. Wyrazem dojrzałości naukowej mgr Zembskiej jest też krótki rozdział dotyczący zalet i ograniczeń pracy, których jest świadoma.

Autorka zaproponowała 6 wniosków, które znajdują pełne oparcie w całości wywodów.

Piśmiennictwo, bardzo obszerne, głównie anglojęzyczne składa się z 260 pozycji, i co istotne, nie pomija również istotnych doniesień polskich autorów. Rozprawa zawiera też streszczenia w językach polskim i angielskim.

Przechodząc do zbiorczej oceny dysertacji przedłożonej przez mgr Agnieszkę Zembską stwierdzić trzeba, że rozprawa ta dotyczy zagadnienia ciekawego, aktualnego, bardzo ważnego nie tylko dla badaczy zajmujących się teoretycznie tyreologią, ale jak sądzę, w przyszłości również dla lekarzy praktyków.

Według Recenzenta przeprowadzone badania przyniosły ważne dane dotyczące etiologii procesów autoimmunologicznych tarczycy, głównie w aspekcie regulacji procesu apoptozy. Zaslugą Autorki jest więc dokonanie w zasadzie pionierskich badań rozszerzających nasz dotychczasowy pogląd na omawiane tu zagadnienie. Zbierając krótko w całość niniejszą ocenę stwierdzić trzeba, iż rozprawa wykazuje bardzo dobrą ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki co do odpowiednich rozdziałów biologii oraz endokrynologii – głównie tyreologii, dowodzi także umiejętności prowadzenia pracy badawczej w tym zakresie. Oceniana rozprawa nosi cechy samodzielnego dorobku naukowo-badawczego Autorki, spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy 1 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm), zgłaszam przeto do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Zembskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

10.08.2007

Prof. dr hab. n. med. Bogdan Marek  
Specjalista chorób wewnętrznych  
ENDOKRYNOLOG  
5364397