

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anicety Ady Mikulskiej-Sauermann pt. "Ocena parametrów biochemicznych i antropometrycznych oraz sposobu żywienia osób z niedoczynnością tarczycy w przebiegu przewlekłego autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy" wykonanej pod kierunkiem prof. zw. dr hab. Franciszka Głównki z Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki Kolegium Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Etiologia choroby Hashimoto (HT) nie jest całkowicie zdefiniowana. Tarczyca jest narządem najbardziej podatnym na procesy autoimmunologiczne. W populacji kaukaskiej u 20% - 40% osób stwierdza się nacieki limfocytarne w próbkach pośmiertnych, a najwyższy odsetek występuje u kobiet. Nacieki limfocytarne w obrębie tarczycy wywołują przewlekły stan zapalny, sprzyjający rozwojowi chorób autoimmunologicznych, które najczęściej prowadzą do autoimmunologicznej niedoczynności tarczycy, zapalenia tarczycy Hashimoto. U większości pacjentów z HT stwierdza się przeciwciała przeciwko antygenom występującym w tarczycy, przede wszystkim przeciwko peroksydazie tarczycowej (anty-TPO), tyreoglobulinie (anty-Tg) i przeciwciała blokujące receptor TSH (TBII), co prowadzi do destrukcji gruczołu. Diagnostyka HT opiera się na objawach klinicznych korelujących z wynikami laboratoryjnymi podwyższonego TSH przy prawidłowym lub niskim poziomie tyroksyny. Jednakże niewiele dowodów wskazuje na rolę przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej w patogenezie autoimmunologicznej choroby tarczycy. Przeciwciała anty-TPO mogą wiązać dopełniacz i niszczyć tyreocyty co wykazano *in vitro*. Jednakże brak jest przekonujących danych wskazujących na korelację między stopniem zaawansowania HT a stężeniem przeciwciał anty-TPO w surowicy, natomiast wskazuje się na dodatnią korelację między stężeniem przeciwciał anty-TPO w surowicy i aktywną fazą choroby. Sugeruje się również potencjalną rolę kompleksów immunologicznych zawierających przeciwciała przeciw tarczycowe w procesie destrukcji tarczycy. Wśród innych możliwych czynników patogenetycznych HT wymienia się czynniki środowiskowe (tj. zanieczyszczenia, mikroelementy), osobnicze (styl życia, stan hormonalny, dieta, mikrobiota jelitowa) oraz genetyczne, które mogą prowadzić do zaburzeń immunologicznych i w konsekwencji zniszczenia tarczycy. Obecnie leczenie HT opiera się na zastępczej terapii hormonalnej. Istnieją jednakże przesłanki, że suplementacja niektórych kluczowych składników odżywczych dla optymalnego funkcjonowania tarczycy, a mianowicie jodu, selenu, cynku, żelaza, witaminy B12 i rozpuszczalnych w lipidach witamin, w tym A, E, D i K może wywierać wpływ na skuteczność leczenia. Do chwili obecnej nie opracowano jednakże ściśle określonych wytycznych/zaleceń dietetycznych dla osób z autoimmunologiczną chorobą tarczycy, wobec braku wysokiej jakości badań.

Wyniki przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Anicety Ady Mikulskiej-Sauermann mogą przyczynić się do lepszego poznania roli witamin w patofizjologii HT.

Na rozprawę doktorską mgr inż. Anicety Ady Mikulskiej-Sauermann składają się trzy opublikowane w czasopiśmie z listy JCR prace; 2 oryginalne i 1 pogładowa, tj. 1. Mikulska A.A., Karaźniewicz-Łada M., Filipowicz D., Ruchała M., Główska F. Metabolic characteristics of Hashimoto's thyroiditis patients and the role of microelements and diet in the disease management – an overview. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(12), 6580. <https://doi.org/10.3390/ijms23126580> (IF 5,6; 140 punktów MEiN); 2. Mikulska-Sauermann A.A., Karaźniewicz-Łada M., Filipowicz D., Ruchała M., Główska F. Measurement of serum vitamins B2 and B6 in patients with Hashimoto's thyroiditis by LC-MS/MS method. *Chromatographia* 2024; 87, 433–443. <https://doi.org/10.1007/s10337-024-04319-x> (IF 1,2; 70 punktów MEiN); 3. Mikulska-Sauermann A.A., Resztak M., Karaźniewicz-Łada M., Filipowicz D., Ruchała M., Główska F. Assessment of vitamin concentrations in patients with Hashimoto's thyroiditis and their relationships with thyroid function, biochemical status, and anthropometric parameters – a preliminary study. *Nutrients* 2024; 16(11), 1694. <https://doi.org/10.3390/nu16111694> (IF 4,8; 140 punktów MEiN). We wszystkich ww. pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, Jej udział w powstaniu każdej z powyżej wymienionych prac wynosi 53-55% i obejmuje współudział w przygotowaniu koncepcji projektu, pozyskaniu funduszy na badanie, opracowaniu i walidacji metody, oznaczeniu stężeń witamin, zbieranie i opracowanie danych, pisanie manuskryptu oraz współpracę z redaktorem czasopisma jako autor korespondencyjny, co świadczy o Jej wiodącej roli i zostało potwierdzone przez pozostałych współautorów poszczególnych prac.

Ponadto przedłożona do oceny praca zawiera wstęp, założenia rozprawy, omówienie prac oryginalnych i pogładowej, wnioski, piśmiennictwo, streszczenia w języku polskim i angielskim, kopie artykułów wchodzących w skład cyklu publikacji, pisemne oświadczenia współautorów prac i orzeczenia komisji bioetycznej, wykaz słów kluczowych i stosowanych skrótów, jak również opis aktywności naukowej Doktorantki.

We wstępie do omówienia publikacji Doktorantka przedstawiła patofizjologiczne podłoże autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy (choroba Hashimoto, HT), z uwzględnieniem potencjalnej roli witamin. Obszerniej powyższe zagadnienia opisano we wstępie oraz dyskusji poszczególnych artykułów będących podstawą pracy doktorskiej.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie Doktorantka sformułowała następujący cel główny pracy: określenie parametrów biochemicznych i antropometrycznych oraz sposobu żywienia osób z niedoczynnością tarczycy w przebiegu przewlekłego autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy oraz następujące cele szczegółowe: 1. analiza danych literaturowych dotyczących charakterystyki badanej populacji, roli witamin i składników mineralnych, sposobu żywienia i wdrożonych interwencji żywieniowych

u osób z przewlekłym autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy; 2. opracowanie i walidacja nowej metody analitycznej do analizy stężeń wybranych witamin z grupy B; 3. ocena odrębności biochemicznych, obejmujących oznaczenie stężeń witaminy A, E, D, B2 i B6, profil tarczycowy i lipidowy oraz parametry gospodarki węglowodanowej u nowo diagnozowanych i leczonych osób z HT oraz 4. wyznaczenie parametrów i wskaźników antropometrycznych badanej populacji.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorantka dokonała analizy danych literaturowych dotyczących charakterystyki badanej populacji, roli witamin i składników mineralnych, sposobu żywienia i wdrożonych interwencji żywieniowych u osób z przewlekłym autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy pochodzących z randomizowanych badań kontrolowanych, metaanaliz i badań klinicznych z lat 2012-2022, z wykorzystaniem bazy danych PubMed, Cochrane, Medline i Embase. Analizując metodykę przeglądu literatury należy zauważyć, że współczesna analiza powinna się opierać o system PRISMA, będący „złotym standardem” dokumentowania przeglądów systematycznych. Następnie Doktorantka opracowała i dokonała walidacji nowej metody LC–MS/MS do jednoczesnego oznaczania witaminy B2 i B6 w surowicy pacjentów z przewlekłym autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy. Opracowana i zwalidowana metoda LC–MS/MS do pomiaru stężeń witaminy B2 i B6 w surowicy spełnia wymagania walidacyjne EMA dla metod bioanalitycznych (jest wystarczająco czuła, specyficzna, powtarzalna, odtwarzalna, dokładna i precyzyjna). Zwalidowana metoda LC–MS/MS została zastosowana do oznaczania stężeń witaminy B2 i B6 w surowicy pacjentów z ustalonym rozpoznaniem choroby Hashimoto (HT) rekrutowanych w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (UMP). W kolejnym etapie Doktorantka dokonała oceny stężeń witaminy A, E, D, B2 i B6, profilu tarczycowego (TSH, fT4, fT3, TPOAb i TgAb) i lipidowego (TC, HDL-C, LDL-C, TG), markerów gospodarki węglowodanowej (FBG, insulina) oraz parametrów antropometrycznych (masa i wysokość ciała, obwodu talii (WC) i bioder (HC)) u pacjentów z przewlekłym autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy. Do pomiaru stężeń witamin D (25-hydroksywitaminy D3), witaminy A (retinolu) i witaminy E (α -tokoferolu) w osoczu użyto metodę LC–MS/MS wg Karaźniewicz-Łada i wsp. oraz autorskiej metody LC–MS/MS do oceny stężeń witaminy B2 i B6. Stężenia TSH, fT4, fT3, TPOAb i TgAb w surowicy określono za pomocą komercyjnych zestawów wykorzystujących elektrochemiluminescencję (ECLIA), natomiast stężenia parametrów lipidowych (TC, HDL, LDL, TG), FBG i insuliny oceniano za pomocą metody enzymatycznej ze standaryzowanymi testami komercyjnymi. Kryteria włączenia i wyłączenia z badania są prawidłowo opracowane. Należy jednakże zauważyć, jak stwierdza sama Doktorantka, że badanie obejmowało pacjentów z HT z różnym stopniem zaawansowania choroby (od eutyreozy do jawnej niedoczynności tarczycy) oraz braku uwzględnienia suplementacji witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Wnioskowanie utrudnia również krótki okres

półtrwania niektórych z badanych witamin w badanych płynach ustrojowych, np. witaminy B2 wynoszący 66-84 minut lub też B6 - 1.7 godziny.

W oparciu o opracowaną metodykę Doktorantka uzyskała następujące wyniki, m. in. wykazała, że metoda LC-MS/MS do pomiaru stężeń witaminy B2 i B6 w surowicy spełnia wymagania walidacyjne EMA dla metod bioanalitycznych; BMI nie różnicowało pacjentek z HT i zdrowych kobiet podobnie jak stężenia TC, HDL, LDL, TG, FBG i insuliny; pacjentki z HT miały istotnie statystycznie niższe stężenie witaminy B2 w porównaniu z grupą kontrolną ($7,13 \pm 7,59$ ng/ml vs. $12,09 \pm 9,62$ ng/ml; $p = 0,003$); nie występują różnice w stężeniu witaminy B6 w badanych populacjach ($30,89 \pm 19,49$ ng/ml w grupie badanej vs. $37,29 \pm 23,02$ ng/ml w grupie kontrolnej; $p > 0,05$); pacjentki z HT miały istotnie statystycznie niższe stężenia witaminy A w porównaniu z grupą kontrolną ($395,88 \pm 385,56$ ng/ml vs. $422,21 \pm 134,98$ ng/ml; $p = 0,003$); stężenia witaminy E (HT $-16,23 \pm 6,36$ μ g/ml vs. kontrola $-16,64 \pm 6,10$ μ g/ml; $p > 0,05$) oraz witaminy D (HT $-19,58 \pm 11,20$ ng/ml vs. kontrola $-21,78 \pm 11,18$ ng/ml; $p > 0,05$) były podobne w obu analizowanych grupach, lecz stężenia witaminy D znajdowały się poniżej rekomendowanych wartości; w całej badanej populacji, w tym u pacjentów z HT, stwierdza się ujemną korelację między stężeniem witaminy B2 a stężeniem TSH, jak również pomiędzy stężeniem witaminy B6 a procentową zawartością tkanki tłuszczowej w całkowitej masie ciała u pacjentek z HT oraz stężeniem TPOAb w grupie kontrolnej; w całej badanej populacji i w grupie pacjentek z HT występuje związek między podwyższonym stężeniem witaminy A a zwiększonym BMI, WHR, procentową zawartością tkanki tłuszczowej w całkowitej masie ciała oraz stężeniem TG i insuliny.

Uzyskane wyniki Autorka umiejętnie odniosła do aktualnych danych literaturowych (zarówno w omówieniu publikacji jak też i samych publikacjach stanowiących integralną część przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej).

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła dziesięć wniosków: Opracowana metoda LC-MS/MS oznaczania witaminy B2 i B6 w surowicy ludzkiej spełnia wymagania walidacyjne EMA dla metod bioanalitycznych. Jest wystarczająco czuła, specyficzna, powtarzalna, odtwarzalna, odpowiednio dokładna i precyzyjna. Metoda pozwala na ocenę stężeń tych witamin w populacji z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy i może być również stosowana w innych jednostkach chorobowych; 2. Analiza porównawcza wykazała obniżone stężenia witaminy B2 i A w populacji z przewlekłym autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy w porównaniu do osób zdrowych; 3. Nie zaobserwowano różnic w stężeniach witaminy D, E i B6 między badanymi grupami. W obu badanych populacjach ponad połowa osób miała niedobór witaminy D, co wskazuje na potrzebę jej suplementacji w całej populacji; 4. W grupie z HT wykazano ujemną korelację między stężeniem witaminy B2 a stężeniem TSH, co może wskazywać na potencjalny korzystny wpływ tej

witaminy na funkcję tarczycy.; 5. W badaniu wykazano związek między zwiększonym stężeniem witaminy B6 a zmniejszeniem procentowej zawartości tkanki tłuszczowej w całkowitej masie ciała u pacjentów z HT, co potwierdza wpływ tej witaminy na metabolizm; 6. U pacjentów z HT stężenie witaminy D było dodatnio skorelowane ze stężeniem HDL-C i ujemnie z BMI, procentową zawartością tkanki tłuszczowej w całkowitej masie ciała oraz stężeniem insuliny. Parametry te są istotne w kontekście ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych; 7. Brak różnic w parametrach antropometrycznych, profilu lipidowym, stężeniach glukozy i insuliny w grupie HT i grupie kontrolnej wskazuje, że nie są one kryterium determinującym występowanie przewlekłego autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy; 8. Pacjenci z HT powinni mieć rutynowo oznaczane stężenia witamin, aby zapobiegać niedoborom żywieniowym, które mogą mieć negatywny wpływ na przebieg choroby i ryzyko rozwoju zaburzeń metabolicznych. Wyniki przeprowadzonych badań mogą być pomocne w opracowaniu metod skutecznej suplementacji dla osób z HT; 9. Analiza danych literaturowych dotyczących sposobu żywienia osób z HT i stosowanych interwencji żywieniowych wykazała ochronny efekt diety przeciwzapalnej, opartej na produktach roślinnych, a eliminującej produkty pochodzenia zwierzęcego; 10. Farmakoterapia w połączeniu z odpowiednią suplementacją i sposobem żywienia mogą być kluczowymi elementami opieki medycznej nad pacjentami z niedoczynnością tarczycy w przebiegu przewlekłego autoimmunizacyjnego zapalenia tarczycy.

Sformułowane przez Doktorantkę wnioski dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy danych uzyskanych w czasie realizacji badań. Być może należałoby ostrożniej formułować niektóre stwierdzenia, np. : „... kryterium determinującym występowanie...”(posiadając jedynie dane dotyczące korelacji). Wniosek 8 wydaje się być zbyt ogólny, ponieważ stężenia tylko niektórych witamin różnicowały obie badane grupy. Analizując treść wniosku 9 należałoby zwrócić uwagę na metodologię doboru prac ujętych w przeglądzie literatury.

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Doktorantki, która dobrze opanowała wymagany warsztat badawczy i wykazała bardzo dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Dlatego też zwracam się do Rady Kolegium Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Anicety Ady Mikulskiej-Saueremann do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy, docenionej również przez grono międzynarodowych ekspertów, recenzentów uznanych czasopism, wnioskuję o wyróżnienie pracy *summa cum laude*.

Prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik