

Dr hab. Marcin Szczepanik
Zakład Diagnostyki Klinicznej
i Dermatologii Weterynaryjnej
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 27.02.2023

Recenzja

Rozprawy doktorskiej lek. wet. Pauliny Lis-Lenartowicz na temat: „Ocena zmian wybranych parametrów biofizycznych skóry w przebiegu leczenia niedoczynności tarczycy u psów”.

Recenzja została przygotowana zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 24 stycznia 2023 roku. Oceniana praca na stopień doktora w dyscyplinie Weterynaria została wykonana w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Promotorem naukowym pracy jest dr hab. Jarosław Popiel prof. UP, promotorem pomocniczym dr n. wet. Agnieszka Cekiera.

Niedoczynność tarczycy jest najpowszechniej rozpoznawaną dermatozą endokrynną u psów. Występowanie tego problemu określa się na około od 0,2 do 0,8% w całej populacji, a w Polsce szacuje się, że niemal 7% wszystkich konsultowanych dermatologicznie pacjentów stanowią psy z niedoczynnością tarczycy. Choroba ta dotyczy wielu układów i w jej przebiegu obserwowane są objawy związane z licznymi narządami. Niewątpliwie najpowszechniej stwierdzane są te, dotyczące skóry, przebiegające najczęściej w postaci pseudosymetrycznych wyłysień. W przypadku problemów dermatologicznych niezwykle istotnym aspektem jest zarówno rozpoznanie, jak i monitorowanie postępów leczenia. W ocenie stanu skóry w ostatnich latach powszechnie wykorzystywane jest badanie parametrów biofizycznych. Najczęściej stosowany jest pomiar przesnaskórkowej utraty wody (TEWL), oraz korneometria (uwodnienie naskórka), nieco rzadziej meksametria (pomiar natężenia rumienia i melaniny), pomiar odczynu skóry, temperatury skóry, pomiar natłuszczenia powierzchni skóry. Doktorantka podjęła się zbadania niezwykle interesującego problemu jakim jest ocena szeregu parametrów biofizycznych skóry u psów z niedoczynnością tarczycy oraz prześledzenie ich zmienności w trakcie podjętego leczenia suplementacyjnego. Podjęty problem jest nowatorski, jak dotychczas ocena parametrów biofizycznych skóry badana była przede wszystkim u zwierząt zdrowych (psów, kotów i koni) oraz u psów w przypadku chorób alergicznych. Brak jest jakichkolwiek informacji dotyczących oceny tych parametrów u psów z niedoczynnością tarczycy. Na szczególne uwzględnienie zasługuje fakt szerokiego doboru metod w doświadczeniu. O ile TEWL czy korneometria są metodami rutynowo już stosowanymi w ocenie skóry u zwierząt, to takie metody jak meksametria czy pomiar natłuszczenia powierzchni skóry jak dotychczas nie były szeroko stosowane. Podkreślić należy, że w odniesieniu do oceny parametrów mechanicznych: wiskoelastyczności i anizotropii skóry praca ma charakter pionierski w skali światowej, ponieważ metody te nie były dotychczas stosowane u psów (a szerzej u zwierząt), zarówno chorych jak i zdrowych. Uzyskane przez doktorantkę wyniki w odniesieniu do tych ostatnich metod mogą posłużyć w przyszłości do ustalenia norm fizjologicznych tych parametrów u psów.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 120 stron maszynopisu i posiada klasyczny układ z rozdziałami: streszczenie w języku polskim i angielskim, alfabetyczny wykaz skrótów, wstęp, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, spis tabel, spis rycin, spis fotografii. Piśmiennictwo obejmuje 83 pozycje literatury. Dokumentacja graficzna składa się z 9 tabel, 12 rycin i 2 fotografii.

Wstęp omawia aktualny stan wiedzy dotyczący niedoczynności tarczycy u psów ze szczególnym uwzględnieniem aspektów klinicznych oraz rozpoznawania i leczenia choroby. **W opinii recenzenta w tym miejscu należałoby wspomnieć o zespole dyshormonozy tarczycowej z eutyreozą (ang. euthyroid sick syndrome), który może stanowić problem w rozpoznawaniu choroby.** W podrozdziale dotyczącym objawów klinicznych są one wystarczająco opisane w odniesieniu do problemów dermatologicznych jak i związanych z układami: krążenia, nerwowym czy rozrodczym. **Zabrakło natomiast informacji o wpływie niedoczynności na narząd wzroku, również występujących w przebiegu niedoczynności tarczycy (lipidowa dystrofia rogówki, zapalnie rogówki czy tęczówki).** W rozdziale przy edycji przed publikacją należałoby poprawić nazewnictwo **hiperpigmentacja – przebarwienie, dystalnych – dalszych.**

Doktorantka w dalszej części wstępu szczegółowo opisuje poszczególne metody pomiaru parametrów biofizycznych, zarówno te powszechnie stosowane, jak TEWL czy korneometra jak również rzadziej używane jak pomiar natłuszczenia powierzchni skóry, meksametria, pomiar odczynu skóry, temperatury skóry czy wiskoelastyczności i anizotropii skóry.

Doktorantka nie ustrzegła się tu pewnych niedociągnięć pisząc, że sebumetria nie była do tej pory używana w ocenie stanu skóry u psów. **Informacje na ten temat są bardzo skąpe, ale dostępne są nieliczne publikacje z jej wykorzystaniem** „Cheol-Youn Hwang , Tae Ho Oh Effects of commercial topical shampoos on skin Surface sebum in normal canine skin J Vet clin 2002, 19, 225-227 i „Yoon-Seo Jeong Tae-Sik Yun, Ji-Houn Kang, Mahan-Pyo Yang, Byeong Teck Kang, Variation in repeted measurements of transepidermal water loss, skin hydration and sebum level in normal beagel dogs, J Biomed Transl Res 2017, 18, 097 -101”

Podobnie w odniesieniu do zastosowania meksametrii. W literaturze rzeczywiście brak jest informacji dotyczącej oceny zawartości melaniny, natomiast odnośnie drugiego ocenianego parametru tj. natężania rumienia takie publikacje są dostępne. „S. Bae, J. Yu, H. Jeong, T. Oh Anti-pruritic effect of topical capsaicin against histamine-induced pruritus on canine skin Pol J Vet Scien 2018, 21, 789–796” oraz Zajac M, Szczepanik MP, Wilkołek PM, Adamek ŁR, Pomorski ZJ, Sitkowski W, Gołyński Assessment of a correlation between Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI-03) and selected biophysical skin measures (skin hydration, pH, and erythema intensity) in dogs with naturally occurring atopic dermatitis. Can J Vet Res. 2015, 79, 136-40.”

Ostatni podrozdział wstępu opisujący wpływ niedoczynności tarczycy na parametry biofizyczne skóry odnosi się do danych z medycyny człowieka, gdyż prawdą jest, że podjęte przed doktorantką badania mają charakter pionierski i nie były prowadzone u psów. **Ocenę taką w odniesieniu niektórych parametrów przeprowadzono jednak u szczurów z eksperymentalnie wywołaną niedoczynnością tarczycy.**

Marcin Gołyński, Marcin Szczepanik, Krzysztof Lutnicki, Łukasz Adamek, Magdalena Gołyńska, Piotr Wilkołek, Wiesław Sitkowski, Łukasz Kurek, Piotr Dębiak Biophysical parameters of rats' skin after the administration of methimazole Bull Vet Inst Pulawy 2014, 58, 315-319,

Doktorantka postawiła sobie 3 cele szczegółowe:

- oznaczanie wartości parametrów biofizycznych skóry u psów zdrowych i z niedoczynnością tarczycy,
- określenie wiarygodnego obszaru ciała do oceny ww. parametrów,
- prześledzenie zmian w parametrach biofizycznych w przebiegu leczenia, wykazanie ewentualnych zależności pomiędzy stężeniem hormonów tarczycy a parametrami biofizycznymi skóry.

Cele są prawidłowo sformułowane, takie badania nie były do tej pory podejmowane u psów z niedoczynnością tarczycy, mają one duży aspekt poznawczy, a potencjalnie również praktyczny w monitorowaniu postępów leczenia, co jak dotychczas znajduje zastosowanie jedynie w odniesieniu do atopowego zapalenia skóry u psów.

Wyselekcjonowana do badań grupa zwierząt jest właściwie scharakteryzowana i wystarczająco liczna do przeprowadzenia analizy statystycznej.

W pierwszym podrozdziale metodyki opisującym badanie kliniczne ogólne i szczegółowe badanie skóry (badanie dermatologiczne), zastrzeżenie budzi użyte nazewnictwo, które wymaga poprawy przed publikacją. **Wyłysienia, hiperpigmentacja (czy lepiej użyć terminu przebarwienia) ścieńczenie, hipertrofia (lepiej - przerost) i oczywiście powikłania bakteryjne nie są wykwitami. Należy użyć określenia badano następujące zmiany: obecność wyłysień, etc. Przy redagowaniu tekstu do publikacji należy wprowadzić stosowną poprawkę.**

Ponieważ na etapie badania klinicznego i dermatologicznego nie jest znane rozpoznanie, badanie dermatologiczne powinno obejmować wszystkie okolice ciała, a nie jedynie ukierunkowane na określone rozpoznanie. **Z opisu w dalszej części manuskryptu wynika, że badanie to wykonywano na etapie klasyfikowania pacjentów do poszczególnych grup, recenzent jest przekonany, że doktorantka prawidłowo wykonała badanie dermatologiczne, należy jedynie podać informacje, że nie ograniczono się do okolic ciała badanych w dalszej części doświadczenia.** Odnośnie doboru okolic do dalszej oceny nie budzi to zastrzeżeń, okolice te są typową lokalizacją zmian w przebiegu niedoczynności tarczycy.

Sprecyzowania wymaga informacja o obecności wykwitów świadczących o powikłaniach bakteryjnych. Należy uszczegółowić jakie to wykwitów autorka ma na myśli.

Ponadto w metodyce należałoby szczegółowo scharakteryzować jakie badania mikologiczne zostało wykonane, czy było to badania hodowlane czy PCR.

W przypadku badania z zastosowaniem Sebometru doktorantka wykonała pomiaru jednorazowo w odróżnieniu od wcześniejszych pomiarów prowadzonych pięciokrotnie. Z jakiego powodu w tym przypadku pomiar był jednorazowy a nie 3 lub 5 krotny jak w przypadku innych parametrów?

W rozdziale analiza statystyczna brak jest informacji na temat metody zastosowanej do oceny korelacji, z dalszej części manuskryptu wynika, że zastosowano jednoczynnikową analizę regresji liniowej, informacje należałoby umieścić w tym miejscu.

Odnośnie wyników badań: hematologicznych i biochemicznych ułatwieniem w ich prezentacji byłoby przedstawienie ich w postaci wykresów w odniesieniu do tych, które wykazały istotność statystyczną. Podobnie można by zaprezentować wyniki badania kardiologicznego.

Wyniki uzyskane na podstawie przeprowadzonych pomiarów parametrów biofizycznych skóry doktorantka przedstawiła w postaci tabel, na szczególną uwagę zasługują tutaj pomiary parametrów mechanicznych skóry (wiskoelastyczności i anizotropii skóry), które to, jak nadmieniono uprzednio, nie były jak dotychczas oceniane u psów. Doktorantka wykluczyła wpływ na pomiary takich parametrów jak długość okrywy włosowej czy też różnice pomiędzy lewą i prawą stroną ciała. Wykazała natomiast związek pomiędzy wiekiem a parametrami biofizycznymi, z których interesującym spostrzeżeniem jest wykazanie utraty elastyczności skóry wraz ze starzeniem się.

Interesującą zależnością zaobserwowaną przez doktorantkę jest związek pomiędzy stężeniem fT4 a TEWL, fT4 korelował ujemnie z TEWL co wskazuje, że niskie stężenie hormonów tarczycy negatywnie wpływa na stan bariery skórnej.

Wartościową obserwacją jest ponadto stwierdzona przez doktorantkę dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem T4 i fT4 a natłuczeniem oraz ujemna korelacja stężenia hormonów tarczycy (fT4) i pH. Odczyn i natłuczenie mogą pozostawać ze sobą w bezpośrednim związku ponieważ za odczyn skóry odpowiadają między innymi lipidy na jej powierzchni.

Wykazanie związku pomiędzy zawartością hemoglobiny (meksametia) a poziomem fT4 potwierdza, że spadek poziomu hormonów tarczycy negatywnie wpływa na ukrwienie skóry.

Doktorantce udało się przy pomocy obiektywnego pomiaru udowodnić, że istnieje związek pomiędzy poziomami hormonów tarczycy a parametrami mechanicznymi skóry, niższe poziomy hormonów prowadzą do niższej elastyczności i mniejszej anizotropii skóry.

U psów chorych doktorantka stwierdziła, że wiek ma wpływ na odczyn skóry - im pies był starszy tym odczyn wyższy – odwrotnie niż w przypadku psów zdrowych.

W odróżnieniu od zwierząt zdrowych nie udało się wykazać wpływu hormonów tarczycy na właściwości mechaniczne skóry.

Porównanie psów zdrowych i chorych wykazało statystycznie istotną różnicę odnośnie TEWL na boku klatki piersiowej, a więc okolicy, gdzie najczęściej występują zmiany w przebiegu choroby, co interesujące w grupie z niedoczynnością wartość ta była niższa, co świadczy o lepszej integralności bariery skórnej, jest to wynik nieoczekiwany.

Oдноśnie uwodnienia doktorantka stwierdziła przesuszenie naskórka u psów chorych, wykazała ponadto występowanie zwiększonego natłuszczenia skóry w tej grupie, jak również różnicę w parametrach mechanicznych skóry.

Badania nie potwierdziły, by w ciągu 10 tygodniowego leczenia suplementacyjnego doszło do istotnych zmian w parametrach biofizycznych (wyjątkiem była temperatura w jednej okolicy ciała).

W dyskusji autorka odnosi się do danych literaturowych zestawiając swoje wyniki z aktualnymi pracami innych autorów. Słusznie podsumowuje uzyskane w swoich badaniach wyniki wskazujące na zróżnicowanie wartości parametrów zależnie od okolicy ciała, co znajduje potwierdzenie w licznych opublikowanych już pracach.

Autorka w swoich badaniach stwierdziła odmienne zachowanie się odczynu skóry u zwierząt kontrolnych - spadek parametru z wiekiem i badanej - wzrost z wiekiem, niewykluczone, że za tą rozbieżność odpowiada odmienna aktywność gruczołowa u psów zdrowych i chorych.

Nie w pełni jasna jest przyczyna dlaczego u zwierząt zdrowych TEWL jest niższy niż u chorych, parametr ten wskazujący na integralność naskórka u psów zdrowych powinien być niższy, próba wyjaśnienia tego wyniku odmienną szybkością metabolizmu nie w pełni wyjaśnia tą kwestię.

Słusznie doktorantka natomiast wyjaśnia korelację pomiędzy stężeniem hormonów tarczycy, a TEWL, spadek stężenia hormonów tarczycy negatywnie wpływa na stan bariery skórnej. **Niestety przeprowadzone badania nie potwierdziły, by suplementacja hormonów tarczycy poprawiała integralność naskórka, który to wynik był oczekiwany. Niewykluczone, że niezbędne jest poszerzenie grupy, by taką zależność wykazać lub też konieczne jest wydłużenie czasu obserwacji.**

Oдноśnie wyników uwodnienia doktorantka uzyskała wyniki wskazujące na podniesienie tego parametru w grupie kontrolnej. Większe uwodnienie wskazuje na lepszą integralność naskórka (parametr jest ujemnie skorelowany z TEWL) wynik ten jest zgodny z oczekiwaniami, **Kontrowersyjny jest natomiast wynik ujemnej korelacji fT4 z korneometrią. Spodziewać należałoby się, że podniesiony poziom hormonów tarczycy**

poprawi uwodnienie naskórka. Wyjaśnianie tej obserwacji wymaga dalszych badań na większej liczbie pacjentów. Należy podkreślić, że we wcześniej publikowanych badaniach u psów, parametr ten nie zawsze zachowywał się tak jak w przypadku człowieka tj. nie zawsze był ujemnie skorelowany z TEWL.

Sprzeczność pomiędzy odmienną korelacją odczynu, a stężeniem hormonów tarczycy w grupie badanej (im niższe stężenie fT4 tym niższy odczyn) i kontrolnej (spadek T4 - wzrost pH), doktorantka wyjaśnia funkcją kwaśnego odczynu w ochronie przed zakażeniami bakteryjnymi. Nie można wykluczyć, że za odmiennym zachowaniem się odczynu stoją, jak już nadmieniono, zaburzenia w aktywności gruczołowej u psów chorych.

Wyjaśnienie wzrostu temperatury na powierzchni ciała podczas suplementacji jako przyspieszenie metabolizmu jest trafne.

Doktorantka stwierdziła statystycznie istotną różnicę w zawartość łoju na powierzchni skóry pomiędzy zwierzętami chorymi i zdrowym (wyższa u psów z niedoczynnością) oraz dodatnią korelację pomiędzy poziomami hormonów a natłuszczeniem, niestety wyniki te są wzajemnie sprzeczne co uniemożliwia na chwilę obecną ich wykorzystanie w monitorowaniu leczenia. **Niezbędne są szersze badania obejmujące większą liczbę ocenianych okolic ciała, co może umożliwić wykazanie takich korelacji**, jak doktorantka słusznie zauważa, zespół keratolotokowy jest powszechny u psów z niedoczynnością, co potwierdza pierwsza z dokonanych obserwacji.

Uzyskane przez autorkę sprzeczne korelacje odnośnie wyników meksametrii, pomiędzy grupą kontrolną, a badaną mogą być następstwem stanu skóry, przykładowo jej przebarwieniem – autorka wykazała, że skóra jest bardziej przebarwiona w przypadku niskiego poziomu hormonów tarczycy. Wzrost ilości pigmentu może zaburzać odczyt rumienia.

W związku z tym, że ocena parametrów mechanicznych skóry została przez doktorantkę zastosowana u psów po raz pierwszy, nie ma możliwości zestawiania wyników z pracami innych autorów. Wszelkie poczynione przez doktorantkę obserwacje, również te dotyczące sposobu wykonywania pomiaru są niezwykle wartościowe.

W ostatniej części dyskusji doktorantka podnosi ograniczenia dotyczące swojej pracy takie jak: nie uwzględnienie wpływu diety i rasy na wyniki oraz stosunkowo nieliczna grupa zwierząt. Świadomość ograniczeń uzyskanych wyników świadczy o dojrzałości badawczej doktorantki.

Pierwszy wniosek jest sformułowany prawidłowo, choć należy uwzględnić ograniczenia wynikające z niezbyt dużej liczebności grupy i do wyznaczenia wartości referencyjnych niezbędne są dalsze badania na większej grupie zwierząt.

Drugi wniosek nie budzi zastrzeżeń, analiza statystyczna wskazuje podaną okolicę jako najbardziej wiarygodną.

W odniesieniu do trzeciego wniosku zalecałbym większą ostrożność w jego formułowaniu, i zmianę kategoryczności twierdzenia, „**nie dochodzi do upośledzenia funkcji barierowej skóry**” na że „**tego typu upośledzenie nie zostało wykazane**”. Tu również należy brać pod uwagę, że liczba badanych osobników mogła być zbyt niska lub też należałoby włączyć dodatkowe okolice do oceny, ewentualnie uwzględnić inne czynniki jak np. rasę czy żywienie, a być może wydłużyć czas obserwacji.

Literatura dobrana jest prawidłowo, należy dokonać ujednolicenia sposobu jej cytowania, w niektórych artykułach podany jest poza wolumenem numer wydania (np. pozycje 4, 8, 12, 13, 15, 20, 26, 33, 34, 44, 48, 51, 52, 55, 56,57, 61,64, 71, 72,75,77, 80, 81).

Podsumowując całokształt rozprawy doktorskiej należy podkreślić nowatorstwo podjętych badań. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz, nowoczesnych metod użytych do

oceny stanu skóry. Uzyskane wyniki zostały zestawione w sposób trafny z aktualnym piśmiennictwem. Całość pracy jest bardzo dobrze zaplanowana i zrealizowana, doktorantka doskonale opanowała techniki badawcze wykorzystywane w dermatologii weterynaryjnej. Wymienione we wcześniejszej części recenzji uwagi w większości mają charakter edycyjny i łatwo mogą zostać poprawione lub też uzupełnione podczas przygotowania pacy do druku.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska pani lek. wet. Pauliny Lis-Lenartowicz „Ocena zmian wybranych parametrów biofizycznych skóry w przebiegu leczenia niedoczynności tarczycy u psów” spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14.03.2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U z 2003 Nr 65 poz.595 z późniejszymi zmianami) w zw. z art. 179 ust.3 z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U z 30 sierpnia 2018 poz.1669). Przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Pauliny Lis-Lenartowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W związku z nowatorskim charakterem podjętych badań, zwracam się również z prośbą do Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z wnioskiem o nagrodzenie rozprawy doktorskiej stosowną dla Wydziału i Uniwersytetu nagrodą.