KATEDRA I KLINIKA DERMATOLOGII, WENEROLOGII
I DERMATOLOGII DZIECIĘCEJ
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
SAMODZIELNY PUBLICZNY SZPITAL KLINICZNY NR 1
W LUBLINIE
ul. Staszica 11, 20-081 Lublin, tel/fax : +48 81 532-36-47
klinika.dermatologii@umlub.pl
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Dorota Krasowska

Prof. zw. dr hab. n. med. Dorota Krasowska
Katedra i Klinika Dermatologii,
Wenerologii i Dermatologii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Lublin 10.09.2020

Ocena rozprawy doktorskiej

lek.med. Agaty Kłosowicz" Ocena komórek dendrytycznych jako markera predykcyjnego odpowiedzi na terapię hydroksychlorochiną u pacjentów z pierwotnym łysieniem bliznowaciejącym.

Pierwotne łysienie bliznowaciejące obejmuje zróżnicowaną grupę chorób, w których na skutek toczącego się procesu zapalnego dochodzi do nieodwracalnego uszkodzenia mieszków włosowych i utraty włosów. Pomimo wielu badań etiopatogeneza choroby nie została poznana, wiadomo że utrata mieszków jest wynikiem uszkodzenia poprzez naciek zapalny regionu wybrzuszenia zawierającego nabłonkowe komórki macierzyste. Do czynników aktywujących zapalenie należą czynniki genetyczne, środowiskowe, immunologiczne oraz utrata przywileju immunologicznego, czyli systemu mechanizmów niwelujących reakcję immunologiczną w kierunku własnych antygenów. Wiadomo, że uszkodzenie mieszka włosowego w przebiegu łysienia bliznowaciejącego jest spowodowane aktywacją autoreaktywnych limfocytów w odpowiedzi na nieznany antygen ulegający ekspresji w mieszku. U chorych na DLE naciek limfocytarny zlokalizowany w górnej części mieszka włosowego może być wynikiem aktywacji komórek Langerhansa w odpowiedzi na nieznany antygen powstały na skutek apoptozy keratynocytów indukowanej przez promieniowanie ultrafioletowe. Podobne

mechanizmy patogenetyczne z udziałem komórek prezentujących antygeny mogą być zaangażowane w powstawaniu LPP i FFA.

Utrata włosów u chorych na pierwotne łysienie bliznowaciejące jest procesem nieodwracalnym, u wielu chorych obecne są dokuczliwe objawy subiektywne: uczucie bólu, pieczenia, napięcia oraz przeczulicy skóry. Warto podkreślić, że wczesna interwencja terapeutyczna może zatrzymać postęp choroby. W terapii LPP i FFA stosuje się miejscowe glikokortykosteroidy i inhibitory kalcyneuryny, zaś w terapii ogólnej hydroksychlorochinę, doustne retinoidy, leki immunosupresyjne oraz inhibitory 5-a-reduktazy. Dotychczas jednak nie opracowano wytycznych leczenia PCA a u wielu chorych odpowiedź na wymienioną terapię jest często niewystarczająca. Ważne zatem jest poszukiwanie czynników, które warunkują dobrą lub nieadekwatną odpowiedź na terapię. Dlatego wybór tematu pracy doktorskiej lek.med Agaty Kłosowicz dotyczący oceny komórek dendrytycznych jako markera predykcyjnego odpowiedzi na terapię hydroksychlorochiną u pacjentów z pierwotnym łysieniem bliznowaciejącym uważam za bardzo ważny i aktualny.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 106 stron, cytuje 220 pozycji piśmiennictwa, zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim,podsumowanie najważniejszych wyników badań oraz spis treści i zamieszczonych skrótów. Dodatkowe zamieszczenie spisu rycin i tabel ułatwiłoby recenzentowi odniesienie się do poszukiwanej treści. Została zredagowana i podzielona na rozdziały według klasycznego schematu stosowanego w rozprawach doktorskich, zawiera 21 starannie dobranych i opisanych tabel, 16 rycin i 9 niepodpisanych, pięknych klinicznych fotografii obrazujących różne typy łysienia bliznowaciejącego co stanowi bardzo dobrą dokumentację. W bardzo ciekawym i wskazującym na zapoznanie się z najbardziej istotnymi pozycjami piśmiennictwa wstępie Doktorantka omówiła budowę włosa, cykl włosowy oraz scharakteryzowała pierwotne łysienie bliznowaciejące w aspekcie klasyfikacji, epidemiologii, patogenezy. Dokładnie omówiła obraz kliniczny, cechy dermoskopowe, histopatologiczne,, kryteria rozpoznania oraz możliwości terapeutyczne. W dalszej części wstępu scharakteryzowała komórki dendrytyczne w aspekcie klasyfikacji, pochodzenia, cech fenotypowych i ich roli fizjologicznej. Dalej omówiła możliwe mechanizmy działania leków przeciwmalarycznych w aspekcie patogenezy pierwotnego łysienia bliznowaciejącego. Wstęp jest bardzo dobrze napisany, opatrzony wyjątkowo starannie przygotowanymi rycinami i świetnie wprowadza czytelnika w dalsze etapy pracy. We wstępie w tabeli 3. zamieściła fotografie przypadków klinicznych chorych z pierwotnym

łysieniem bliznowaciejącym oraz odpowiadający im obraz histopatologiczny, pod, którym opisała także badanie DIF, które warto by uzupełnić o stosowne obrazy fluorescencji.

Założenia i cele pracy zostały sformułowane w sposób jasny i precyzyjny. Doktorantka podjęła się oceny ekspresji subpopulacji komórek dendrytycznych w biopsjach skóry u chorych na PCA. Kolejnym celem była ocena przydatności pomiaru ekspresji komórek dendrytycznych w biopsjach skóry jako nowego kryterium klasyfikacyjnego pierwotnego łysienia bliznowaciejącego. Oceniała także ekspresję subpopulacji komórek dendrytycznych w aspekcie markera predykcyjnego skuteczności terapii hydroksychlorochiną.

Było to badanie retrospektywne kohortowe, do którego włączyła 65 pacjentów z pierwotnym łysieniem bliznowaciejącym z naciekiem limfocytarnym. Wśród badanych kobiety stanowiły 93,8%, chorzy z DLE i LPP stanowili 27,7%, z FFA 23,1%, w końcowym stadium PCA 16,9%, chorzy z łysieniem rzekomo bliznowaciejącym Brocqa 3,1%, zaś z mucynozą mieszkową 1,5%. Doktorantka określiła także jasne kryteria włączenia i wyłączenia do badania, które uwzględniały m.in. co najmniej 6-miesięczną kuracje w dawce min. 200mg/d przez 5 dni w tygodniu. Z badanej grupy wyłączyła chorych, u których stosowano w ciągu ostatnich 6 -mcy leczenie ogólne oraz palących papierosy. Chorych włączonych do badania podzieliła na dwie grupy: adekwatnie i nieadekwatnie odpowiadających na leczenie. U wszystkich badanych przed wdrożeniem terapii hydroksychlorochiną wykonano panel badań immunohistochemicznych celem analizy ekspresji receptorów subpopulacji komórek dendrytycznych. Ocenę skuteczności terapii hydroksychlorochiną Doktorantka przeprowadziła na podstawie retrospektywnej analizy dokumentacji medycznej. Podczas każdej wizyty dokonywano oceny klinicznej aktywności i rozległości zmian chorobowych . Przeprowadzano także badanie dermoskopowe oraz test pociągania. Dokumentowano obecność objawów subiektywnych takich jak: świąd, uczucie pieczenia i bólu. Badanie immunohistochemiczne wykonano z użyciem następujących przeciwciał monoklonalnych: langeryna, CD1a, CD206, CD123, CD11c, wycinki tkankowe barwiono ręcznie zgodnie z rutynowym protokołem laboratorium. Ilościową analizę subpopulacji komórek dendrytycznych przeprowadzono w mikroskopie świetlnym na podstawie liczby wybarwionych komórek (brązowe wybarwienie błon i cytoplazmy). Wybarwione komórki były zliczane przy 40 krotnym powiększeniu i oceniane w lokalizacjach: mieszkowej, okołomieszkowej, w obrębie naskórka i skóry właściwej w niezależnych skrawkach tkankowych osobno dla CD11c, CD206, CD123, a łącznie dla langeryny i CD11a.

Zebrane dane Doktorantka poddała analizie statystycznej przy pomocy: średniej, mediany, odchylenia standardowego (SD) oraz rozstępu kwartylnego (IQR). Dla porównania zmiennych liczbowych w dwóch grupach chorych zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya zaś test Kruskala-Wallisa do porównania większej liczby grup. Związek między dwoma zmiennymi kategorycznymi badano testem Fishera. Odpowiedź na terapię hydroksychlorochiną oceniano na podstawie modelu regresji logistycznej, który miał na celu wyjaśnić czy predyktor użyty w modelu może być użyteczny do różnicowania pacjentów, u których wystąpiła adekwatna bądź nieadekwatna odpowiedź na terapię hydroksychlorochiną.

W wykonanych badaniach Doktorantka wykazała istotnie wyższą liczbę komórek plazmocytoidalnych CD123+ u chorych na DLE w porównaniu do chorych z innym typem łysienia bliznowaciejącego, były one rozmieszczone okołomieszkowo i w skórze właściwej. Konwencjonalne komórki dendrytyczne CD11c+ były rozmieszczone podobnie niezależnie od rozpoznania łysienia, występowały one głównie w obrębie blizny (okołomieszkowo) i w mniejszym stopniu w mieszku włosowym oraz skórze właściwej. Doktorantka nie obserwowała istotnych różnic w ilości tych komórek cDCs w poszczególnych jednostkach chorobowych. Liczba komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego CD206+ w skórze właściwej była istotnie wyższa u chorych na DLE w porównaniu do innych typów łysienia. Lokalizowały się głównie okołomieszkowo, a w przypadkach mucynozy mieszkowej obecne były wewnątrz mieszka włosowego oraz w naskórku. Komórki Langerhansa LCs w podobnej liczbie występowały u wszystkich pacjentów wyłącznie w obrębie naskórka (pojedyncze w przypadku FM), natomiast w grupie chorych na DLE obserwowano ich istotnie większą liczbę również w okolicy mieszkowej. W dalsze części pracy Doktorantka wykazała, że 31 chorych (47,7%) spośród 65 wszystkich leczonych dobrze odpowiedziało na terapię hydroksychlorochiną, zaś u 34 osób (52,3%) doszło do progresji choroby. Adekwatna odpowiedź na leczenie HCQ wystąpiła aż u dwóch trzecich chorych na DLE (66,7%, N=12), u 64% z późnym okresem PCA (N=11), u połowy pacjentów z FFA (46,7%, N=7) oraz u co piątej osoby z LPP (22,2%, N=4), ale różnice w odsetku osób, u których wystąpiła dobra odpowiedź na terapię HCQ nie były istotne statystycznie. Co ciekawe wśród pacjentów, u których wystąpiła adekwatna odpowiedź na terapię hydroksychlorochiną, wielkość nacieku złożonego z komórek z ekspresją białka CD123 była istotnie wyższa w porównaniu do tych, którzy nie odpowiedzieli na leczenie. Podobnie wielkość nacieku z konwencjonalnych komórek dendrytycznych cDC2 z ekspresją markera CD11c oraz komórek Langerhansa z ekspresją markera CD1a/CD207 była istotnie wyższa dla osób, u których wystąpiła dobra odpowiedź na zastosowaną terapię. Autorka nie obserwowała różnic w wielkości nacieku z

komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego CD206 a adekwatną odpowiedzią na leczenie HCQ. U połowy chorych z PCA leczonych HCQ wystąpiła dobra odpowiedź na terapię, Doktorantka przy zastosowaniu modelu regresji logistycznej wykazała, że obecność naciekających komórek dendrytycznych plzamocytoidalnych CD123+ może być brana pod uwagę jako marker odpowiedzi na HCQ. W tabelach prezentujących wyniki w rubryce p value (można zastąpić polską nazwą) warto wpisać wszystkie wyliczone p dla badanych grup. Podobnie wartości p znacznie wzbogaciłyby prezentowane ryciny. Interesujące byłoby porównanie ilości i rozmieszczenia komórek dendrytycznych w skórze zdrowej w porównaniu do chorych, co może stanowić dalszy etap badań Doktorantki. Sugeruję także podpisać fotografie z uwzględnieniem powiększenia pod jakim preparaty były oglądane, dotyczy to wszystkich zamieszczonych w pracy fotografii.

Otrzymane wyniki badań własnych Doktorantka bardzo logicznie, konsekwentnie i wnikliwe przedyskutowała w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Cały rozdział dyskusji cechuje się wielką starannością, dociekliwością i krytycyzmem w zakresie różnic uzyskanych wyników badań własnych w kontekście wyników uzyskanych przez innych autorów. Rozdział ten jest bardzo dobrze napisany, świadczy o dojrzałości naukowej Autorki, zawiera dobrze dobrane i wykorzystane w pracy pozycje piśmiennictwa.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała 3 wnioski, z czego 2 stanowią odpowiedź na wcześniejsze założenia pracy, natomiast ostatni wniosek nie wynika z przeprowadzonych badań Doktorantki a z danych literaturowych. Piśmiennictwo jest bardzo bogate zawiera zarówno klasyczne jak i najnowsze, głównie anglojęzyczne pozycje, które są stosownie cytowane w tekście, nie mniej jednak cytowanie pracy Maroon 1992 str. 22 nie zostało uwzględnione w piśmiennictwie. Praca napisana jest ładnym językiem, bardzo dobrze się czyta, Doktorantka w sposób dojrzały i precyzyjny uzasadnia uzyskane różnice badań czy brak skuteczności stosowanej terapii. Nie mniej jednak zdarzają się błędy stylistyczne i redakcyjne np. wycinki skórne pobierano biopsją sztancową w średnicy 4mm, a nie 4 μm. W tabeli 5. użyła określenia końcowe stadium PCA, warto zamieścić stosowne wyjaśnienie tego stanu. Rozumiem, że rycina 11 przedstawia porównanie liczebności konwencjonalnych komórek dendrytycznych CD11c+ a nie plazmocytoidalnych CD123+. We wstępie Autorka zamieściła piękne fotografie klinicznych obrazów pierwotnego łysienia bliznowaciejącego, warto by pod nimi umieścić stosowne podpisy. Podobnie zamieszczone fotografie obrazów histopatologicznych we wstępie i immunohistochemicznych w rozdziale „Metody" wymagają

uzupełnienia powiększenia pod jakim zostały wykonane. W tabeli 3. Pod opisem wyników histopatologicznych zamieściła wyniki badania DIF, ciekawe byłoby zamieszczenie stosownych fotografii. W całej pracy Doktorantka stosuje określenie „terapia systemowa", wydaje się, że bardziej odpowiednie byłoby zastosowanie „terapia ogólna". Zastanawiam się czy w bezpośrednim badaniu immunohistochemicznym można oceniać złogi C3 i IgG? str 47, czy nie w DIF?. W ocenie skuteczności leczenia brała pod uwagę cechy kliniczne, dermoskopowe i subiektywne takie jak świąd i bolesność, zobrazowanie tych cech odpowiednimi skalami np. VAS byłoby bardziej obiektywne. Jako klinicystę interesuje mnie po jakim czasie terapii HCQ obserwowano poprawę u chorych na PCA, jak długo lek stosowano i czy po odstawieniu leku obserwowano nawroty?

Za szczególne wartości pracy uważam:

1. Wybranie interesującego pod względem klinicznym tematu pracy doktorskiej mającego duże znaczenie teoretyczno-kliniczne w aspekcie ekspresji komórek dendrytycznych w różnych typach pierwotnego łysienia bliznowaciejącego oraz skuteczności terapii HCQ.
2. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że Autorka po raz pierwszy opisała różnice w liczebności i rozmieszczeniu konwencjonalnych komórek dendrytycznych cDC2 oraz komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego CD206+ u chorych na PCA z naciekiem limfocytarnym, warto zatem uzyskane wyniki badań jak najszybciej opublikować.
3. U wielu chorych na PCA leczonych HCQ odpowiedź na terapię okazuje się niewystarczająca i do końca nie wiemy dlaczego, zatem poszukiwanie przyczyny tego stanu jest ogromnie ważne. Doktorantka po raz pierwszy wykazała, że obecność komórek dendrytycznych plazmocytoidalnych w nacieku może być markerem adekwatnej odpowiedzi na terapię HCQ, co niewątpliwie stanowi ważne klinicznie osiągnięcie Autorki.

Przytoczone wcześniej uwagi nie dotyczą merytorycznej części pracy. Podsumowując, pracę doktorską lek.med Agaty Kłosowicz oceniam bardzo dobrze. Doktorantka udowodniła dobre przygotowanie teoretyczne, umiejętności zaprojektowania i realizacji wyznaczonych celów badawczych, a także analizy i dojrzałego omówienia otrzymanych wyników i prawidłowego wnioskowania. Wyniki przeprowadzonych badań mają duże znaczenie teoretyczno-kliniczne, co jest ważnym osiągnięciem Doktorantki.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wszelkie warunki określone w Ustawie o Tytule i Stopniach Naukowych i dlatego mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagielońskiego Collegium Medicum w Krakowie wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na duża wartość merytoryczną i kliniczną pracy wnioskuję o jej wyróżnienie.

28/09/2020

prof. dr hab. n. med. Dorota Krasowska
specjalista dermatolog-wenerolog
562172