WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY
OF WARSAW

Katedra i Klinika
Dermatologiczna
02-008 Warszawa
ul.Koszykowa82a
dermatologia@wum.ed
u.pl

Warszawa, 30.10 2022 r.

Ocena rozprawy doktorskiej lekarz Karoliny Englert
pt. „Ocena ekspresji endosomalnych receptorów Toll-like typu 7, 8, 9 (TLR-7, 8, 9) w biopsjach skórnych u pacjentów ze zmianami skórnymi w przebiegu tocznia rumieniowatego (SCLE/DLE) oraz ich znaczenie w przewidywaniu odpowiedzi klinicznej na leczenie hydroksychlorochiną"

Skórne postacie tocznia rumieniowatego są heterogenną grupą manifestacji klinicznych, które mogą występować w przebiegu tocznia rumieniowatego układowego (SLE) lub jako odrębne jednostki chorobowe, bez współistniejących objawów układowych. Patomechanizm powstawania tych zmian z dominującym udziałem procesów autoimmunologicznych, jest złożony i nie w pełni poznany,. Wspólną cechą wszystkich lub prawie wszystkich skórnych manifestacji tocznia rumieniowatego jest odkładanie się złogów immunoglobulin i składowych komplementu na granicy skórno-naskórkowej. Innymi wspólnymi cechami łączącymi poszczególne manifestacje kliniczne tocznia rumieniowatego jest obraz histopatologiczny *interface dermatitis* oraz tworzenie się nacieków zapalnych z

komórek limfocytarnych. Mechanizm immunologiczny decydujący o różnej odpowiedzi pacjentów na różne metody farmakoterapii nie został poznany. Doktorantka podjęła się trudnego zadania analizy ekspresji endosomalnych receptorów Toll-like typu 7, 8, 9 w biopsjach skórnych u pacjentów ze zmianami skórnymi w przebiegu tocznia rumieniowatego oraz ich potencjalnego znaczenia w przewidywaniu odpowiedzi klinicznej na leczenie hydroksychlorochiną, które jest lekiem pierwszego wyboru w przypadku wielu zmian skórnych związanych z toczniem rumieniowatym. Wybranie przez Doktorantkę tego problemu badawczego jest w związku z tym niezwykle istotne.

Przedstawiona do oceny praca lekarz Karoliny Englert: „Ocena ekspresji endosomalnych receptorów Toll-like typu 7, 8, 9 (TLR-7, 8, 9) w biopsjach skórnych u pacjentów ze zmianami skórnymi w przebiegu tocznia rumieniowatego (SCLE/DLE) oraz ich znaczenie w przewidywaniu odpowiedzi klinicznej na leczenie hydroksychlorochiną" ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy 142 strony, składa się z wprowadzenia, wyznaczonych przez Autorkę celów pracy, materiałów i metod, wyników badań, dyskusji i wniosków. Praca zawiera również streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa, spis tabel i rycin.

Wprowadzenie do pracy to oparte na najnowszych danych literaturowych informacje na temat tocznia rumieniowatego stanowiące wartościowy materiał wprowadzający w dalsze części dysertacji. Doktorantka w obszernym tekście starannie i szczegółowo omawia różne postacie tocznia rumieniowatego, w tym obserwowane polekowe postacie, częste w dobie rozwiniętej farmakoterapii. Wstęp zawiera również omówienie obrazu histopatologicznego zmian skórnych oraz obrazu immunopatologicznego. W części poświęconej patogenezie choroby Doktorantka przedstawia podłoże genetyczne choroby oraz rolę czynników zewnątrzpochodnych, w tym podkreśla rolę promieniowania UV i palenia tytoniu. Wstęp zawiera nowoczesne dane na temat przeciwciał przeciwjądrowych, udziału wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i zaburzeń apoptozy oraz roli komórek nacieku zapalnego w patogenezie skórnego tocznia rumieniowatego. Doktorantka zaprezentowała współczesne poglądy na temat leczenia tocznia rumieniowatego, szczegółowo omawiając miejsce leków przeciwmalarycznych oraz przedstawia rolę receptorów Toll-like.

Autorka podjęła temat nie w pełni wyjaśnionej roli receptorów TLR typu 7,8,9 w rozwoju tocznia rumieniowatego i różnej odpowiedzią na leczenie zmian skórnych w przebiegu tocznia rumieniowatego poszukując związku z hamowaniem szlaków sygnałowych zależnych od endosomalnych receptorów TLR typu 7 i 9. Szczegółowymi celami pracy, które postawiła przed sobą Doktorantka była ocena siły ekspresji receptorów TLR typu 7, 8, 9 w naskórku oraz w obrębie limfocytów nacieku zapalnego, ocena grubości

naskórka oraz grubości części nabłonkowej mieszka włosowego z pozytywnym odczynem immunohistochemicznym receptorów TLR typu 7, 8, 9., ocena odsetka limfocytów z pozytywnym odczynem immunohistochemicznym dla receptorów TLR typu 7, 8, 9, analiza korelacji poziomu ekspresji receptorów typu 7, 8, 9 i odpowiedzi na leczenie hydroksychlorochiną ocenianą według wskaźnika Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index. oraz nasilenia choroby ocenianym według tego wskaźnika. Trafnie dobrane cele pracy świadczą o umiejętności planowania badań przez Doktorantkę.

.W rozdziale dotyczącym materiałów i metod Autorka opisała grupę badaną: 66 pacjentów ze zmianami skórnymi w przebiegu tocznia rumieniowatego (w tym DLE i SCLE), Badanych pacjentów podzielono na podgrupy w zależności od stosowanego leczenia różnymi dawkami hydrosychlorochimny w monoterapii lub terapii skojarzonej. U pacjentów włączonych do badania wykonano badania biochemiczne, oznaczenia obecności ANA, składowych dopełniacza C3 i C4, u części immunoglobulin. Przeprowadzono ocenę ekspresji receptorów TLR typu 7, 8, 9 w biopsjach skórnych, a następnie dokonano analizy korelacji ekspresji receptorów typu 7, 8, 9 i odpowiedzi na leczenie hydroksychlorochiną ocenianą według wskaźnika CLASI po 3- 6 miesięcznym okresie terapii. Dokonano także analizy korelacji stopnia nasilenia choroby według CLASI przed włączeniem leczenia ogólnego immunomodulującego i immunosupresyjnego z podtypem skórnego tocznia rumieniowatego (SCLE, DLE) i wybranymi parametrami w grupie badanej. Autorka opisała metodykę wykonania badań immunohistochemicxznych. Na przeprowadzenie pracy badawczej uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Wyniki przedstawiono w przejrzysty sposób. Pacjenci z wyższym wskaźnikiem CLASI istotnie częściej prezentowali objawy w postaci: artralgii stawów rąk i stóp i/lub kolan i/lub łokci, limfopenii i niedokrwistości chorób przewlekłych. Zależność pomiędzy wskaźnikiem nasilenia choroby ocenianym w skali CLASI, a obecnością małopłytkowości u pacjentów z CLE była na granicy istotności statystycznej. Nie wykazano ekspresji TLR typu 7 w obrębie naskórka u pacjentów z CLE i w grupie kontrolnej. Biopsje skórne zarówno skóry zdrowej jak i zmian o typie CLE charakteryzowały się ekspresją TLR 8 i 9 w obrębie naskórka, części nabłonkowej mieszka włosowego oraz ekspresją TLR 7, 8, 9 w obrębie nacieku limfocytarnego w skórze właściwej. Pacjenci z CLE wykazywali istotnie statystycznie niższą siłę ekspresji TLR typu 9 w naskórku, mniejszą grubość naskórka z pozytywną ekspresją receptorów TLR typu 8, 9 oraz niższy średni odsetek limfocytów z pozytywną ekspresją receptorów TLR typu 8, 9 w stosunku do grupy kontrolnej. Ekspresja receptora TLR typu 9 w obrębie części nabłonkowej mieszka włosowego była istotnie statystycznie niższa w biopsjach pacjentów zarówno z SCLE jak

i DLE w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto pacjenci z SCLE charakteryzowali się istotnie wyższą ekspresją TLR typu 8 w obrębie naskórka w porównaniu do pacjentów z DLE. U pacjentów z DLE zaobserwowano istotnie wyższą ekspresję TLR typu 9 w obrębie naskórka oraz części nabłonkowej mieszka włosowego w porównaniu do pacjentów z SCLE. Siła ekspresji TLR typu 9 w obrębie limfocytów u pacjentów z SCLE i DLE korelowała z odpowiedzią na leczenie hydroksychlorochiną i procentowym obniżeniem się wskaźnika CLASI po leczeniu. Chorzy z najlepszą odpowiedzią na leczenie hydroksychlorochiną (obniżenie się wskaźnika CLASI po leczeniu powyżej 80%) prezentowali najwyższą silę ekspresji TLR typu 9 w obrębie limfocytów nacieku zapalnego (3 stopień w skali 0-3). Pacjenci, u których ze względu na niedostateczną odpowiedz na leczenie hydroksychlorochiną w dawce 200 mg/d zwiększono dawkowanie hydroksychlorochiny do 400 mg/d prezentowali istotnie niższą ekspresję receptorów TLR typu 9 w obrębie naskórka (charakteryzowali się mniejszą grubością naskórka z pozytywną ekspresją TLR typu 9) oraz niższy średni odsetek limfocytów z pozytywną ekspresją TLR9 w porównaniu do pozostałych pacjentów leczonych hydroksychlorochiną w dawce 200 mg/d. Uzyskane wyniki poddano właściwie dobranym metodom analizy statystycznej. Wyniki są przedstawione bardzo klarownie.

Dyskusja w pracy przeprowadzona jest konsekwentnie i dojrzale. Autorka podzieliła tę część pracy na podrozdziały i w systematyczny sposób przeprowadziła analizę własnych wyników na tle doniesień literaturowych Dyskusja świadczy o doskonałym opanowaniu warsztatu naukowego przez Doktorantkę i jest wartościową naukowo częścią pracy napisanej w znakomitym krakowskim ośrodku dermatologicznym pod kierunkiem cenionego eksperta pani profesor Anny Wojas-Pelc

W oparciu o uzyskane wyniki lekarz Katarzyna Englert sfomułowała sześć wniosków wypływających z przeprowadzonych przez siebie badań. Wnioski w sposób precyzyjny odpowiadają na postawione cele badawcze. Doktorantka stwierdziła, że pacjenci z wyższym wskaźnikiem CLASI istotnie częściej manifestowali dolegliwości bólowe stawów, limfopenię i niedokrwistość co według Autorki uzasadnia rekomendację do stosowania w szerokiej praktyce klinicznej skali CLASI W pracy nie wykazano ekspresji receptora TLR typu 7 w obrębie naskórka, zarówno w skórze zdrowej, jak i w obrębie zmian skórnych co może wskazywać według Doktorantki, że receptory TLR typu 7 nie odgrywają istotnej roli w powstawaniu zmian skórnych w przebiegu CLE. Rozwój zmian skórnych o typie CLE może być zależny od niższej, w stosunku do skóry zdrowej, ekspresji TLR typu 8 i 9 w obrębie naskórka oraz nacieku limfocytarnego w skórze właściwej oraz niższej ekspresji TLR typu 9 w obrębie części nabłonkowej mieszka włosowego co jak podkreśla Autorka jest zgodne z

badaniami przeprowadzonymi na modelach zwierzęcych oraz modelu in vitro SLE, w których wysoka ekspresja receptorów TLR typu 8 i 9 odgrywała rolę protekcyjną w rozwoju choroby. Ponadto stwierdzenie u chorych z CLE niższej ekspresji TLR typu 8 i 9 w obrębie naskórka oraz niższego odsetka limfocytów w skórze właściwej z pozytywną ekspresją TLR typu 8 i 9 może być niekorzystnym czynnikiem świadczącym o aktywności procesu chorobowego. W zakresie leczenia hydroksychlorochiną: skuteczność leczenia hydroksychlorochiną może zależeć od ekspresji receptora TLR typu 9 w skórze chorych z CLE. Wykazano, że wyższa siła ekspresji TLR typu 9 w obrębie nacieku limfocytarnego w biopsjach skórnych pacjentów z CLE wiązała się z lepszą odpowiedzią na terapię hydroksychlochiną mierzoną procentowym obniżeniem się wskaźnika CLASI po leczeniu a wyższa ekspresja TLR typu 9 w obrębie naskórka i wyższy odsetek limfocytów w skórze właściwej z pozytywną ekspresją TLR typu 9 wiązały się z możliwością zastosowania niższych dawek hydroksychlorochiny koniecznych do uzyskania remisji klinicznej.

Rozprawa doktorska zawiera 12 rycin i 30 tabel. Spis piśmiennictwa liczy 186 współczesnych pozycji literaturowych, w większości anglojęzycznych. Doktorantka celnie wybiera istotne pozycje piśmiennictwa w sposób właściwy cytując je we wstępie oraz w omówieniu. Praca jest doskonale graficznie opracowana, dokumentacja fotograficzna, tabele i ryciny (w tym zaproponowany przez Autorkę schemat działania hydroksychlorochiny) są przejrzyste i czytelne. Drobne błędy językowe i edytorskie nie umniejszają wartości pracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lekarz Katarzyny Englert „Ocena ekspresji endosomalnych receptorów Toll-like typu 7, 8, 9 (TLR-7, 8, 9) w biopsjach skórnych u pacjentów ze zmianami skórnymi w przebiegu tocznia rumieniowatego (SCLE/DLE) oraz ich znaczenie w przewidywaniu odpowiedzi klinicznej na leczenie hydroksychlorochiną"" stanowi oryginalny, własny wkład Doktorantki w rozwój wiedzy medycznej i spełnia warunki ustawowe. W związku z tym mam zaszczyt przedstawić wniosek o dopuszczenie lekarz Katarzyny Englert do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość poznawczą i praktyczną pracy zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. med. Małgorzata Olszewska