GDAŃSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

Prof. dr hab. med. Wojciech Biernat
Katedra i Zakład Patomorfologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, dnia 30 września 2022 roku

**Recenzja pracy doktorskiej lek. med. Karoliny Englert zatytułowanej „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"**

Toczeń rumieniowaty (*lupus erythematosus*, LE) jest jedną z częstszych chorób, które zajmują skórę w przebiegu tego wieloukładowego schorzenia autoimmunologicznego. Wielość postaci klinicznych, jak i odmienny przebieg choroby u różnych chorych, jak również złożona i nie do końca poznana patogeneza powodują zainteresowania badawcze tym schorzeniem naukowców i lekarzy zajmujących się różnymi dyscyplinami medycyny. Przedstawiona mi do oceny praca stanowi kolejną próbę scharakteryzowania tej jednostki, zarówno jeśli chodzi o rolę nieswoistych receptorów odpowiedzi immunologicznej z grupy Toll-like (TLR) oraz wpływ ich ekspresji w komórkach naskórka i napływających do skóry limfocytów na przebieg choroby i wyniki terapii z zastosowaniem hydroksychlorochiny.

Praca ma układ typowy dla publikacji monograficznej, liczy 142 strony tekstu i składa się z 13 rozdziałów, m.in. z wprowadzenia, w którym Doktorantka omówiła cechy kliniczno-patologiczne LE, standardy jego leczenia oraz biologię receptorów TLR, określenia celów pracy, materiału i metodyki, omówienia i podsumowania wyników, dyskusji, wyszczególnionych wniosków oraz piśmiennictwa. W tekście znajduje się 30 tabel oraz siedem rycin. Piśmiennictwo wykorzystane w niniejszej publikacji obejmuje 186 pozycji, które w większości pochodzą z okresu ostatnich lat i ściśle wiążą się z zagadnieniami omawianymi w rozprawie.

Wstęp zawiera wyczerpującą charakterystykę tocznia rumieniowatego, jego stronę kliniczną wraz ze standardami leczenia, złożoną patogenezą i patomechanizmem rozwoju i progresji choroby. Znajdujemy tu omówienie kręgów regulacji odpowiedzi immunologicznej odgrywającej rolę w tych procesach i wreszcie opis receptorów TLR, które stanowią jeden z tematów badawczych zawartych w rozprawie.

Lek. Englert sformułowała cztery hipotezy badawcze i pięć celów szczegółowych swojego badania. Grupę badaną stanowiło 66 chorych ze skórną postacią tocznia będących pacjentami Poradni Dermatologicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie oraz cztery zdrowe osoby tworzące grupę kontrolną. Autorka zebrała dane obejmujące szereg cech klinicznych, immunologicznych i histopatologicznych wraz z przebiegiem choroby i reakcją na zastosowane leczenie, co stanowiło podstawę analiz statystycznych. Badania tkankowe wykonano na materiale pochodzącym z wycinków ze skóry, procesowanych w sposób rutynowy do postaci bloków parafinowych. Ocenę półilościowej intensywności ekspresji białek TLR 7, 8 i 9 przeprowadzono osobno w odniesieniu do komórek naskórka i limfocytów nacieku zapalnego. Rezultaty tych analiz korelowano z postacią kliniczną tocznia (krążkowy *vs* podostry) oraz z odpowiedzią na leczenie hydroksychlorochiną. W tym celu wykorzystano skalę CLASI do pomiaru nasilenia zmian skórnych przed włączeniem leczenia i po 3-6 miesięcznym okresie terapii. Do analizy statystycznej uzyskanych wyników lek. Englert wykorzystała test sumy rang Wilcoxona lub Kruskala-Wallisa oraz test chi-kwadrat Pearsona lub test Fishera. Analizy dokonano przy pomocy programu statystycznego R4.0.5 (R Core Team 2021).

Lekarz K. Englert stwierdziła częstsze występowanie artralgii, limfopenii i niedokrwistości chorób przewlekłych u chorych z wyższym wskaźnikiem CLASI oraz graniczną korelację małopłytkowości z tym wyznacznikiem. Stanowi to potwierdzenie zasadności wykorzystania tej skali do identyfikacji pacjentów, u których mogą rozwinąć się pozaskórne objawy tocznia rumieniowatego.

Doktorantka wykazała także niskie znaczenie ekspresji TLR typu 7 dla rozwoju zmian skórnych w CLE, natomiast obniżenie ekspresji TLR typu 8 i 9 wraz z naciekiem limfocytarnym w skórze determinował ich występowanie oraz związek z aktywnością procesu chorobowego. Konfrontacja z dostępnym piśmiennictwem potwierdziła te wyniki. Z drugiej strony wzrost ekspresji TLR typu 9 w nacieku limfocytarnym wiązał się z lepszą odpowiedzią na leczenie hydrochlorochiną, co umożliwiało obniżenie dawek leku niezbędnych do uzyskania efektu klinicznego.

Całość pracy potwierdziła moim zdaniem dojrzałość naukową Doktorantki, która sprawnie posługuje się metodyką badawczą, krytycznie potrafi odnieść się do uzyskanych wyników oraz w sposób jasny prowadzi wywód osiągając jednoznaczne wnioski. Dyskusję kończy sześć wniosków, znajdujących uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych badań. Wnioski te należy uznać za trafne i pozostające w prostej zależności do założonych celów pracy.

Rozprawę doktorską lek. Karoliny Englert oceniam dobrze. Znajduję jednak szereg kwestii, które wymagają wyjaśnień. Zasadniczym problemem w interpretacji uzyskanych wyników jest lokalizacja identyfikowanego odczynu immunohistochemicznego badanych białek. W tabeli 4 i 30 (które raczej powinny być nazwane rycinami) zdjęcia ukazują reakcję jądrową (lub jąderkową – tab. 4, odczyn „3+" w naskórku), podczas, gdy TLR są białkami cytoplazmatycznymi, co zresztą potwierdzają mikrofotogramy przykładowych odczynów tych markerów umieszczone

przez producenta stosowanych przez Doktorantkę przeciwciał na stronie firmy ABCAM. Wątpliwości budzi także zademonstrowana w 'tabeli' 4 skala siły ekspresji odczynu, gdyż zarówno odczyn '3+' w naskórku i limfocytach wydaje się najsłabszy ze wszystkich przedstawionych dla danej struktury histologicznej. Kwestie te wymagają jednoznacznego wyjaśnienia przez Doktoratkę.

Z punktu widzenia językowego pragnę także zwrócić uwagę, że liczba mnoga słowa 'osobnik' w odniesieniu do człowieka/ludzi brzmi 'osobnicy'; termin 'osobniki' są prawidłowe w stosunku do okazów gatunku, np. gryzoni, i dopiero w tym znaczeniu Autorka stosuje go poprawnie. Doktorantka nie ustrzegła się także licznych błędów językowych w tekście, co winno podlegać korekcie.

Po zapoznaniu się z rozprawą stwierdzam, że ma ona charakter pełnej, zwartej monografii stanowiącej samodzielne dzieło badawcze. Doktorantka nie sfinalizowała swoich wyników w formie oryginalnych publikacji, jednak w przesłanych mi wytycznych Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego przyjmuje się w wyjątkowych przypadkach możliwość uzyskania stopnia doktora w oparciu o formę monografii. Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska może zatem spełniać te rekomendacje, jak i ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W. Bu