Dr hab.med Beata Kręcisz, prof. UJK
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
Klinika Dermatologii
Ul. Radiowa 7
Kielce

RECENZJA
Pracy doktorskiej lekarz *Joanny Bacharewicz-Szczerbickiej*

„Ekspresja wybranych receptorów toll-like i wewnątrzkomórkowej osteopontyny w efektorowej fazie alergicznego kontaktowego zapalenia skóry"

Promtor: dr hab.n.med. Teresa Reduta

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest wynikiem badań Doktorantki dotyczących wybranych elementów patomechanizmu alergicznego kontaktowego zapalenia skóry (AKZS). Pomimo tego, że alergiczne kontaktowe zapalenie skóry jest chorobą znaną od wielu lat i należy do najczęstszych dermatoz, to mechanizmy regulujące przebieg reakcji zapalnej nie są wciąż dokładnie poznane. U osób uczulonych, po kontakcie z określonym alergenem rozwija się wyprysk kontaktowy o różnym stopniu nasilenia i różnej lokalizacji zależnej od czynnika wywołującego. Osoby chore, ze względu na przewlekły i nawrotowy charakter schorzenia skarżą się na ograniczenie jakości życia i stygmatyzację. Problem jest szczególnie ważny w kontekście chorób zawodowych skóry. AKZS jest najczęstszą dermatozą wywołaną środowiskiem pracy. Konsekwencją uczulenia jest niejednokrotnie konieczność zmiany zawodu, gorsza pozycja na rynku pracy, obniżenie jakości życia i pogorszenie sytuacji materialnej rodziny. Również dotkliwe są koszty ekonomiczne ponoszone przez całe społeczeństwo (koszty leczenia, diagnostyki, koszty czasowej niezdolności do pracy, rehabilitacji, reedukacji). Szacuje się, że rocznie w Unii Europejskiej wydaje się z tego powodu ok. 700 mln euro. Tak

więc poszukiwanie nowych uwarunkowań regulujących powstanie i przebieg AKZS jest w pełni uzasadnione. Lepsze zrozumienie patomechanizmu choroby może przyczynić się do rozwoju nowych metod terapeutycznych, diagnostycznych i profilaktycznych.

1. STRUKTURA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Recenzowana rozprawa doktorska liczy 124 strony bez załączników, 9 tabel i 44 ryciny. Składa się z części ogólnej, opisu badań własnych, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwa. Wykaz cytowanego piśmiennictwa obejmuje 270 pozycji starannie dobranych do tematyki badań. Część ogólna poprzedzona jest spisem treści oraz wykazem stosowanych skrótów.

Podsumowując: W pracy nie umieszczono informacji o pozytywnej decyzji lokalnej komisji etycznej umożliwiającej podjęcie badań ani nie załączono formularza świadomej zgody pacjenta na udział w badaniu. Należy sądzić, iż jest to niedopatrzenie i zostanie ono wyjaśnione.

2. CHARAKTERYSTYKA I OCENA MERYTORYCZNA

Część ogólna zawiera krótki wstęp będący wprowadzeniem merytorycznym do podjętej pracy. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka na podstawie szerokiego piśmiennictwa omawia epidemiologię , obraz kliniczny AKZS, diagnostykę, zjawiska immunologiczne zachodzące w rozwoju i przebiegu AKZS ze szczegółowym opisem budowy i roli receptorów toll-like (TLR2, TLR4) oraz osteopontyny. Doktorantka podkreśla, że dane dotyczące udziału receptorów toll-like w alergicznym kontaktowym zapaleniu skóry są skąpe i niejednoznaczne. Dotychczas wykazano, że kontakt z haptenem powoduje aktywację receptorów TLR2 na komórkach dendrytycznych co wpływa na polaryzację naiwnych limfocytów T w kierunku odpowiedzi Th1, poprzez wzrost miejscowej produkcji IFN-γ i nasilenie reakcji zapalnej. Jony metali (niklu, kobaltu i palladu) mają zdolność bezpośredniego wiązania TLR4

natomiast związki organiczne takie jak oxazolon i dinitrochlorobenzen (DNCB) aktywują receptory TLR2 i TLR4 na drodze pośredniej. Następnie Doktorantka omawia rolę oraz znaczenie osteopontyny zarówno w stanach fizjologii jak i patologii organizmu. Wskazuje na występowanie osteopontyny w 2 izoformach: wydzielanej pozakomórkowo (sOPN) i wewnątrzkomórkowej (iOPN) oraz zwraca uwagę na fakt, że funkcje obu izoform OPN oraz wzajemne zależności pomiędzy nimi nie zostały dokładnie poznane.

W ostatnich latach zainteresowano się znaczeniem osteopontyny w patogenezie alergicznego wyprysku kontaktowego. U myszy potwierdzono udział sOPN w fazie indukcyjnej akzs, poprzez pobudzenie migracji komórek Langerhansa z naskórka do węzłów chłonnych oraz polaryzację odpowiedzi limfocytów w kierunku Th1. Wykazano również, że keratynocyty oraz limfocyty T efektorowe w skórze wydzielają znaczne ilości sOPN, co ma wpływ na przebieg alergicznego kontaktowego zapalenia skóry. U chorych z rozsianą postacią alergicznego kontaktowego zapalenia skóry stwierdzono wzrost stężenia sOPN w surowicy w okresie ostrym choroby.

Podsumowując: część ogólna opracowana jest z dużą starannością i wnikliwością, wskazuje na dobre merytoryczne przygotowanie Doktorantki do podjętego tematu badawczego.

Drobna uwaga: w podrozdziale dotyczącym epidemiologii należałoby wyraźnie podkreślić różnicę w pojęciach alergiczne kontaktowe zapalenie skóry i alergia kontaktowa, ponieważ nasuwa się przypuszczenie że oba terminy traktowane są tożsamo. Właściwe zrozumienie różnic umożliwi prawidłową interpretacje przytaczanych danych dotyczących częstości występowania obu zjawisk.

Cele badawcze

Doktorantka sformułowała 3 główne cele badawcze:

1. Ocena ekspresji receptorów TLR2 i TLR4 na monocytach i neutrofilach

we krwi obwodowej u chorych z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry.

2. Ocena subpopulacji limfocytów $CD4^+$, $CD4^+CD25^{high}$ i $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ we krwi obwodowej chorych z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry.

3. Ocena subpopulacji limfocytów T $CD4^+$ wytwarzających wewnątrzkomórkową formę osteopontyny we krwi chorych z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry.

Materiał i Metodyka

Materiał

Badania przeprowadzono u 59 pacjentów z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry leczonych w Klinice Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i 46 zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. Rozpoznanie alergicznego kontaktowego zapalenia skóry ustalono na podstawie dokładnie zebranego wywiadu i charakterystycznego obrazu klinicznego zmian chorobowych. W wywiadzie uwzględniano czas wystąpienia, charakter kliniczny i umiejscowienie pierwszych zmian skórnych, związek pomiędzy wystąpieniem zmian a kontaktem z substancją uczulającą w warunkach życia codziennego i pracy zawodowej lub związek z hobby. Określano czas trwania choroby oraz czas utrzymywania się obecnych zmian wypryskowych. Do badań kwalifikowano pacjentów z rozsianą postacią wyprysku (przynajmniej 2 ogniska chorobowe w różnych lokalizacjach) w ostrym okresie choroby. Rozległość i charakter zmian skórnych oceniano w oparciu o wskaźnik EASI zaadoptowany do oceny rozsianej postaci alergicznego kontaktowego zapalenia skóry.

Pacjenci biorący udział w badaniach nie byli leczeni glikokortykosteroidami ogólnie przez minimum 3 tygodnie, nie stosowali

również innych leków immunosupresyjnych, a także leków przeciwhistaminowych. Do badań kwalifikowano chorych z akzs bez objawów klinicznych wtórnej infekcji bakteryjnej w obrębie skóry oraz bez objawów klinicznych i laboratoryjnych ogólnej infekcji bakteryjnej (prawidłowe CRP). Do dalszych badań podzielono chorych na 2 grupy

Grupa I.

Badania ekspresji receptorów toll-like na monocytach i neutrofilach krwi obwodowej przeprowadzono u 33 dorosłych chorych (11 kobiet i 22 mężczyzn), w wieku od 19 do 83 lat (średnia 56,9±13,7) z rozsianą postacią alergicznego kontaktowego zapalenia skóry. Grupę kontrolną stanowiło 25 osób (13 kobiet i 12 mężczyzn) w wieku od 24 do 91 (średnia 50,24 ±17,5) lat. Czas trwania choroby u chorych z wypryskiem należących do I grupy, u których oceniano ekspresję receptorów toll-like wynosił 0,1-60 lat (średnia 9,7 ±15,6) , czas utrzymywania się zmian skórnych od 1 do 10 tygodni (średnia 3,6±2,3). Dodatni wywiad w kierunku chorób atopowych (atopowe zapalenie skóry, astma oskrzelowa, alergiczny nieżyt nosa, alergiczne zapalenie spojówek) stwierdzono u 11 pacjentów (3 kobiet i 8 mężczyzn) . Współwystępowanie innych chorób (cukrzyca typu 2, hipercholesterolemia, dna moczanowa, miażdżyca, przewlekła obturacyjna choroba płuc) stwierdzono u 15 pacjentów (4 kobiet i 11 mężczyzn). Wskaźnik EASI określający nasilenie zmian skórnych wynosił od 5,2 do 37,2 punktów (średnia 13,7±6,97). U 26 pacjentów stwierdzono dodatnie wyniki testów płatkowych.

Grupa 2

Badania ekspresji wewnątrzkomórkowej osteopontyny w limfocytach T wykonano u 26 chorych (15 kobiet i 11 mężczyzn) z akzs w wieku od 19 do 71 lat (średnia wieku 47,2±15,19). Grupę kontrolną stanowiło 21 zdrowych osób: 14 kobiet i 7 mężczyzn w wieku od 24 do 74 lat (średnia wieku 43,5±15,17) . W tej grupie pacjentów z akzs czas trwania choroby wynosił od 6 miesięcy do 30 lat (średnia 13,3±12,3 lat), czas utrzymywania się obecnych

zmian wynosił od 1 do 12 tygodni (średnia 3,8±3,3 tygodnia). Choroby atopowe współwystępowały u 4 osób (3 kobiet i 1 mężczyzny), inne choroby - u 2 (1 kobiety i 1 mężczyzny) . Wskaźnik EASI określający nasilenie zmian skórnych wynosił od 2,4 do 32,6 punktów (średnia 11,8±7,6). Dodatni wynik testów płatkowych stwierdzono u 23 chorych .

W obu grupach pacjentów (Grupa I i Grupa II) z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry oraz zdrowych osób grup kontrolnych oceniano we krwi obwodowej subpopulacje limfocytów T: $CD4^+$, $CD4^+CD25^+$ oraz $CD4^+CD25^{high}127^{low}$.

Skrótową charakterystykę poszczególnych grup badanych i kontrolnych przedstawiono dodatkowo w tabelach co spowodowało lepszą przejrzystość materiału

Podsumowując: Z lektury tego rozdziału wynika, że uczestniczyli w nim chorzy będący w średnim wieku, u których czas choroby wynosił średnio ok. 10 lat a stopień nasilenia zmian chorobowych średnio oceniono na umiarkowany. U 1/3 badanych współistniała atopia a u ok. 40% obserwowano dodatkowo inne schorzenia. Głównymi kryteriami włączenia chorych do grup badanych były: wywiad chorobowy i obraz kliniczny odpowiadający alergicznemu kontaktowemu zapaleniu skóry. W mojej ocenie w kryteriach włączenia należało uwzględnić również stwierdzenie u wszystkich chorych dodatnich wyników testów płatkowych co potwierdziłoby jednoznacznie alergiczny charakter wyprysku.

Metodyka

Ocenę subpopulacji monocytów i neutrofilów wykazujących ekspresję receptorów TLR2 i TLR4 we krwi obwodowej , ocenę subpopulacji limfocytów $CD4^+$, $CD4^+CD25^+$ i $CD4^+CD25^{high}127^{low}$ we krwi obwodowej oraz ocenę ekspresji osteopontyny wewnątrzkomórkowej w limfocytach T krwi obwodowej poszczególnych uczestników badania dokonano za pomocą cytometrii

przepływowej z zastosowaniem cytometru przepływowego Cytomics FC500, Beckman Coulter stosując typowe dla tej metody techniki laboratoryjne.

Analiza statystyczna

Wyniki badań przedstawiono jako średnie wartości poszczególnych parametrów ocenianych dla poszczególnych grup ±odchylenie standardowe. Różnice pomiędzy średnimi dla poszczególnych grup pacjentów z akzs badanych w ostrym okresie choroby i w czasie remisji w przypadku każdego ocenianego parametru obliczano przy użyciu jednowymiarowej analizy wariancji ANOVA i testu t, po sprawdzeniu rozkładu normalnego. W przypadku parametru ocenianego niezależnie różnice obliczano przy użyciu testu Manna-Whithey'a. Średnie z bezwzględnych i odsetkowych wartości leukocytów w badanych grupach porównywano przy użyciu testu Kruskall-Walis'a. Ocenę korelacji pomiędzy poszczególnymi parametrami w badanych grupach przeprowadzono przy użyciu testu korelacji Pearsona lub Spearmana w zależności od rozkładu zmiennych. Wszystkie testy były dwustronne, jako znamienną statystycznie przyjmowano wartość $p < 0,05$. Wszystkie testy przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego TIBCO Statistica Version 13.3 (TIBCO Software Inc).

Podsumowując: przyjęta metodyka badań oraz metody statystyczne nie budzą zastrzeżeń merytorycznych

Wyniki

Wyniki uzyskanych badań i analiz zostały przedstawione w tabelach i wykresach opatrzonych stosownym komentarzem z zaznaczeniem wartości cechujących się znamiennością statystyczną w porównywanych grupach badanych. Doktorantka wykazała że:

- ekspresja receptorów TLR2 i TL4 na monocytach we krwi obwodowej u chorych grupy I z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry i w grupie kontrolnej była statystycznie istotnie wyższa w grupie pacjentów z ostrą

postacią akzs w porównaniu z wartościami obserwowananymi u chorych w okresie remisji i w grupie kontrolnej Natomiast wartości odsetkowe neutrofilów z ekspresją TLR2 i TLR4 nie różniły się w sposób istotny pomiędzy badanymi grupami.

- Nie stwierdzono korelacji dodatniej pomiędzy czasem utrzymywania się zmian skórnych i odsetkiem monocytów z ekspresją receptorów TLR2 i TLR4

- Ekspresja receptorów TLR2 i TLR4 na monocytach i neutrofilach oceniana u chorych z akzs nie wykazywała istotnych różnic w grupach chorych z atopią i bez atopii

- Nie stwierdzono również istotnych różnic pomiędzy odsetkiem monocytów i neutrofilów z ekspresją receptorów TLR2 i TLR4 w zależności od współwystępowania innych chorób.

- Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wielkością wskaźnika EASI a odsetkiem monocytów wykazujących ekspresję TLR2 i TLR4.

- Ekspresja receptorów TLR2 i TLR4 na monocytach krwi chorych z akzs w ostrym okresie choroby nie wykazywała także różnic w zależności od rodzaju uczulającego alergenu kontaktowego.

- Ocena subpopulacji limfocytów T $CD4^+$ wytwarzających wewnątrzkomórkową formę osteopontyny (iOPN) we krwi chorych z akzs i osób zdrowych wykazała, że odsetek limfocytów z ekspresją iOPN był istotnie wyższy u chorych z wypryskiem w ostrym okresie choroby niż chorych w okresie remisji ($p < 0,01$) i osób zdrowych ($p < 0,0001$). W okresie remisji wartość odsetka limfocytów wytwarzających wewnątrzkomórkowo osteopontynę pozostawała nadal istotnie wyższa niż w grupie osób zdrowych ($p < 0,01$).

- Ocena zależności pomiędzy czasem utrzymywania się zmian skórnych a wartością odsetka limfocytów T z ekspresją iOPN wykazała wyższą wartość komórek iOPN u chorych ze zmianami trwającymi nie dłużej niż tydzień, nie była to jednak różnica istotna statystycznie

- W grupie chorych z akzs nie obserwowano istotnych różnic w wielkości populacji limfocytów iOPN^{+} w zależności od współwystępowania atopii czy innych chorób.

- Nie stwierdzono zależności pomiędzy wielkością subpopulacji limfocytów wykazujących ekspresję wewnątrzkomórkowej formy OPN i nasileniem zmian skórnych.

- Wielkości odsetkowe limfocytów z ekspresją iOPN nie różniły się w sposób istotny pomiędzy grupami chorych uczulonych na metale i inne alergeny kontaktowe.

- Ocena wielkości całej populacji limfocytów T CD4^{+} we krwi u chorych z akzs i osób zdrowych nie wykazywała istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami.

- Odsetek limfocytów CD4^{+}CD25^{+} był istotnie wyższy u chorych z wypryskiem w ostrym okresie choroby niż u zdrowych ($p < 0,01$) i pacjentów z akzs w okresie remisji ($p < 0,0001$).

- W grupie pacjentów z rozsianym alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry badanych w ostrym okresie choroby odsetek limfocytów regulatorowych CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low} we krwi był istotnie niższy niż u osób zdrowych ($p < 0,001$) oraz u chorych w okresie remisji choroby ($p < 0,01$).

- Wykazano dodatnia korelację pomiędzy wielkością odsetka limfocytów regulatorowych i stopniem nasilenia zmian skórnych wyrażonych w skali EASI

- Odsetek limfocytów CD4^{+}CD25^{+} oraz CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low} nie korelował z wartością odsetkową limfocytów CD4^{+} z wewnątrzkomórkową ekspresją osteopontyny

Podsumowanie: Prezentacja wyników nie budzi zastrzeżeń. Szczególnie interesujące w mojej ocenie są te, które wskazują na rolę monocytów wykazujących ekspresję receptorów TLR i wewnątrzkomórkowej osteopontyny w patomechanizmie AKZS .

Dyskusja

W rozdziale tym liczącym 13 stron Doktorantka dokonała omówienia uzyskanych wyników badań i kytycznego odniesienia ich do wyników innych autorów podkreślając ,że dane literaturowe odnoszące się do poszczególnych zagadnień są sprzeczne. Prowadzona dyskusja jest ciekawa, wyważona merytorycznie i świadczy o ugruntowanej wiedzy Doktorantki

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorantka sformułowała 8 wniosków końcowych

1. W regulacji przebiegu akzs, w ostrym okresie choroby, mogą odgrywać rolę monocyty wykazujące ekspresję receptorów TLR2 i TLR4 oraz limfocyty T $CD4^+$ wykazujące ekspresję wewnątrzkomórkowej osteopontyny. Przedstawione badania mogłyby również wskazywać na udział różnych subpopulacji limfocytów T $CD4^+$ w przebiegu ACD: limfocytów $CD4^+CD25^+$ oraz limfocytów regulatorowych.

2. W ostrym okresie choroby dochodzi do aktywacji monocytów za pośrednictwem receptorów TLR2 i TLR4, natomiast w okresie remisji zmian skórnych brak jest czynnika aktywującego te komórki lub wydzielane są, nieokreślone dotychczas w wyprysku alergicznym, czynniki hamujące ich funkcje.

3. Hamowanie ekspresji TLR2 i TLR4 na komórkach układu immunologicznego m.in. limfocytach, monocytach mogłoby być nowym kierunkiem leczenia zmniejszającym objawy akzs.

4. Obniżona liczba limfocytów regulatorowych we krwi chorych w ostrym okresie akzs w stosunku do osób zdrowych może wskazywać na przemianę tych komórek w subpopulację limfocytów $CD4^+CD25^+$ lub może wskazywać na ich zwiększoną rekrutację do skóry.

5. Dodatnia korelacja odsetka limfocytów $CD4^+CD25^+$ z wielkością wskaźnika EASI może stanowić pośredni dowód potwierdzający znaczenie aktywowanych limfocytów o fenotypie $CD4^+CD25^+$, obok limfocytów $CD8^+$, jako komórek efektorowych w wyprysku alergicznym.

6. Uwzględniając wyniki wcześniejszych badań wykazujących wzrost surowiczego stężenia sOPN u chorych z ostrym akzs, obserwowany wzrost odsetka limfocytów T z ekspresją iOPN mógłby wskazywać na pochodzenie sOPN z limfocytów krwi oraz możliwość przechodzenia iOPN w sOPN.

7. Wyniki te również mogłyby potwierdzać udział OPN jako cytokiny zapalnej w ostrym okresie ACD i być wskaźnikiem monitorującym przebieg choroby.

8. Zwiększony odsetek limfocytów z ekspresją iOPN w okresie remisji zmian skórnych mógłby wskazywać na ich przedłużoną obecność we krwi, nie dochodzi jednak do uwalniania OPN z komórek T.

Podsumowując: przedstawione wnioski są logiczne i osadzone w uzyskanych wynikach badań.

3. PODSUMOWANIE I WNIOSEK KOŃCOWY

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lekarz Joanny Bacharewicz-Szczerbickiej zatytułowana „ Ekspresja wybranych receptorów toll-like i wewnątrzkomórkowej osteopontyny w efektorowej fazie alergicznego kontaktowego zapalenia skóry" stanowi cenne i nowatorskie opracowanie naukowe, uzupełniające dotychczasową wiedzę z zakresu patomechanizmu alergicznego kontaktowego zapalenia skóry. Uzyskane wyniki mogą stać się punktem wyjściowym do dalszych badań naukowych mających na celu lepsze zrozumienie złożonych patomechanizmów tej choroby co może przełożyć się na poszukiwanie nowych kierunków terapeutycznych. Na szczególną uwagę zasługuje oryginalne wykazanie u ludzi roli wewnątrzkomórkowej osteopontyny w przebiegu AKZS.

Doktorantka zrealizowała postawione w pracy cele badawcze, które pozwoliły na sformułowanie 8 wniosków końcowych odzwierciedlających uzyskane wyniki badań.

Uchybienia wspomniane wcześniej w recenzji nie wpływają na ogólną pozytywną ocenę pracy.

Rozprawa doktorska lekarz Joanny Bacharewicz-Szczerbickiej zatytułowana „ Ekspresja wybranych receptorów toll-like i wewnątrzkomórkowej osteopontyny w efektorowej fazie alergicznego kontaktowego zapalenia skóry" spełnia wymogi *określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, z późn zm.)* na stopień doktora nauk medycznych i w związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lekarz Joanny Bacharewicz-Szczerbickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w zakresie nauk medycznych.

KIEROWNIK
Kliniki Dermatologii
prof. nadzw. dr hab. n. med. Beata Kręcisz
specjalista dermatolog - wenerolog
1508742

20. 08. 2019