UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I KLINIKA DERMATOLOGII

ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. 061 869-12-85, 869-16-12
fax 061 869-15-72
e-mail: dermask2@ump.edu.pl

Prof. dr hab. med. Magdalena Czarnecka-Operacz
Katedra i Klinika Dermatologii oraz
Pracownia Chorób Alergicznych
Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 17.07.2019

Ocena rozprawy doktorskiej

Lek. Joanny Bacharewicz-Szczerbickiej

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

Kontaktowe zapalenie skóry (wyprysk kontaktowy) to grupa zapalnych chorób skóry, w których miejscowa reakcja zapalna rozwija się w następstwie bezpośredniego kontaktu z czynnikami środowiskowymi. Może mieć on podłoże alergiczne warunkujące powstanie alergicznego wyprysku

kontaktowego, w następstwie reakcji z prostymi związkami chemicznymi zwanymi haptenami, lub niealergiczne wywołane przez bezpośredni kontakt z substancjami drażniącymi (wyprysk z podrażnienia) lub toksycznymi takimi jak roztwory kwasów lub zasad.

Klinicznie obie formy wyprysku bywają trudne do zróżnicowania, chociaż niektóre z cech morfologicznych wyprysku toksycznego oraz możliwość przeprowadzenia naskórkowych testów płatkowych stanowią podstawę diagnostyki różnicowej.

Zmiany chorobowe mogą lokalizować się w obrębie różnych okolic ciała (skóra twarzy, szyi, dekoltu, rąk, podudzi itd.) jednakże najczęściej procesem chorobowym objęta jest skóra rąk.

Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry rozwija się na podłożu reakcji immunologicznej typu IV wg klasyfikacji zaproponowanej przez Gella i Coombsa. W ogólnym uproszczeniu można uznać, że po ekspozycji skóry pacjenta na klasyczny hapten zostaje on po wstępnym przetworzeniu prezentowany przez komórki dendrytyczne limfocytom Th1 i w efekcie aktywacji tej subpopulacji limfocytów pomocniczych dochodzi do syntezy oraz uwalniania szeregu cytokin prozapalnych, głównie Il-2 oraz IFN-gamma.

Klasyczna kontaktowa reakcja alergiczna przebiega w kilku etapach. W początkowej fazie indukcji hapteny czyli związki chemiczne poprzez połączenie z białkami endogennymi naskórka tworzą immunogenne kompleksy, które jak już wspomniano wcześniej prezentowane są limfocytom T głównie przez komórki Langerhansa należące do populacji komórek profesjonalnie prezentujących antygen. Uczulone limfocyty T wędrują do okolicznych węzłów chłonnych gdzie dochodzi do ich proliferacji klonalnej.

W wyniku kolejnej ekspozycji na alergen (faza efektorowa) dochodzi do proliferacji limfocytów T zarówno w skórze jak również okolicznych węzłach chłonnych. Swoiście uczulone limfocyty wydzielają szereg mediatorów, które powodują napływ komórek zapalnych: neutrofilów, makrofagów i limfocytów

w następstwie czego dochodzi do powstania zapalenia alergicznego.
Niezależnie od mechanizmu powstawania zmian skórnych wyprysk kontaktowy może mieć przebieg ostry, podostry lub przewlekły.

W **ostrej** postaci zmiany wypryskowe rozwijają się w obrębie skóry eksponowanej na działanie haptenu lub substancji drażniącej i wykazują ewolucyjność wykwitów, od rumienia, poprzez grudki obrzękowe, pęcherzyki i nadżerki do tworzenia strupów i pozapalnego złuszczania. W przypadku ostrego wyprysku w obrazie klinicznym dominują rumień, obrzęk, objawy sączenia, a objawami podmiotowymi odczuwanymi przez pacjenta jest ból, pieczenie oraz świąd skóry. `

W **podostrej** postaci wyprysku stan zapalny jest mniej nasilony, zwykle nie obserwuje się sączenia a jedynie obecność grudek wysiękowych i mniej liczne pęcherzyki.
W tej postaci zmiany skórne cofają się stopniowo po wyeliminowaniu kontaktu z czynnikiem alergizującym lub drażniącym natomiast powtarzalna ekspozycja prowadzić może do nawrotów oraz rozwoju objawów klinicznych wyprysku przewlekłego.

W przypadku wyprysku **przewlekłego** nasilenie zmian rumieniowych i obrzękowych jest mniejsze, natomiast dominuje liszajowacenie, czyli pogrubienie skóry, wzmożenie poletkowania skóry oraz upośledzenie jej sprężystości. Dodatkowo charakterystyczne są przebarwienia lub odbarwienia pozapalne skóry objętej procesem zapalnym. Zmianom skórnym towarzyszy zazwyczaj świąd warunkujący odruch drapania, który z kolei prowadzić może do zaostrzenia procesu chorobowego w efekcie urazu mechanicznego skóry.
Uraz mechaniczny ułatwia i nasila zarówno uwalnianie jak i penetrację uwalnianych z keratynocytów cytokin prozapalnych takich przykładowo jak Il-1, Il-8 i TNF-alfa oraz pochadzących z limfocytów T–Il-2, IL-4 i TNF-gamma. Powoduje to nasilenie rozwijającego się stanu zapalnego skóry.

Uszkodzenie bariery naskórkowej ułatwia dodatkowo rozwój alergii

kontaktowej w odniesieniu do stosowanych miejscowo preparatów leczniczych zwłaszcza kortykosteroidowych, co z kolei może być przyczyną niepowodzeń terapeutycznych, a wręcz prowadzić może do pogorszenia stanu klinicznego pacjentów. Istnieje oczywiście wiele innych odmian wypryski, takich jak łuszczyco-podobny lub łojotokowy, ale co najważniejsze to fakt, że pod morfologiczna maską zmian skórnych o charakterze wyprysku przebiegać może wiele innych, niejednokrotnie niebezpiecznych dermatoz, w tym chłoniaki skóry. Warto o tym pamiętać w naszej codziennej praktyce klinicznej, gdyż pomyłka w zakresie prawidłowego rozpoznania może skończyć się dla pacjenta tragicznie,

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska lek. med. Joanny Bacharewicz-Szczerbickiej liczy 124 strony i zawiera 270 pozycji literaturowych, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, 44 ryciny oraz 9 tabel, których spisu zabrakło mi w końcowej części rozprawy doktorskiej . Praca została zredagowana i podzielona na rozdziały według klasycznego schematu stosowanego w rozprawach doktorskich.

Doktorantka w spisie treści przedstawiła wszystkie elementy swojej rozprawy rozprawy doktorskiej zapoznając czytelnika z problemami naukowo-badawczymi, które w niej porusza w odpowiednio ułożonych, kolejnych, rozdziałach pracy.

Spis zastosowanych w pracy skrótów zdecydowanie ułatwia jej lekturę i stanowi ważna i niezwykle przydatną jej część.

Część ogólną rozpoczyna Wstęp.

We wstępie doktorantka zapoznaje czytelnika z następującymi problemami:

- krótko, ogólnie i treściwe z samym problemem immunologicznych zaburzeń obserwowanych u chorych na alergiczne kontaktowe zapalenie skóry/alergiczny wyprysk kontaktowy (ACD-allergic contact dermatitis),
- przedstawia epidemiologiczne dane dotyczące ACD w ogólnej populacji świata,
- omawia czynniki ryzyka wpływające na rozwój objawów alergii kontaktowej,
- opisuje obraz kliniczny choroby,
- przedstawia możliwości postepowania diagnostycznego w przypadku chorych na ACD lub podejrzenia wspomnianej choroby,
- opisuje już w szczegółach znane na obecnym etapie wiedzy medycznej zjawiska immunologiczne biorące udział w rozwoju i przebiegu ACD,
- omawia szczegółowo udział i znaczenie limfocytów T regulatorowych (Treg) w rozwoju i przebiegu klinicznym ACD,
- następnie udział zjawisk odporności wrodzonej, ze szczególnym uwzględnieniem roli neutrofilów i monocytów ,
- opisuje szczegółowo receptory toll-like, ich budowę i drogi aktywacji (poszczególne szlaki aktywacyjne, bogato ilustujac dane teoretyczne), występowanie receptorów TLR2 i TLR4 na poszczególnych komórkach układu immunologicznego
- następnie przedstawia rolę receptorów TLR2 i TLR4 w wybranych chorobach skóry, z uwzględnieniem chorób alergicznych,

- w ostatniej części tego pod-rozdziału autorka opisuje szczegółowo **osteopontynę,** jej strukturę i funkcję , jak również udział w procesach zapalnych oraz rolę w wybranych chorobach skóry, ze szczególnym uwzględnieniem chorób alergicznych

Wstęp stanowi moim zdaniem znakomite, w pełni wyczerpujące wprowadzenie czytelnika do badań własnych Doktorantki. Warto podkreślić, iż zawarte w tej części rozprawy informacje dotyczą wyjątkowo szerokiej sfery wiedzy odnoszącej się do immunologii doświadczalnej oraz klinicznej, a sam rozdział napisany został we wzorowy i niezwykle interesujący sposób, wzbogacony o ryciny odzwierciedlające zawartą w rozdziale treść merytoryczną prezentującą bardzo wysoki poziom naukowy.

Badania własne doktorantka rozpoczyna od opisu **celu pracy**, który zawarła w trzech jasnych i precyzyjnych punktach. Były nimi **:**

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.

Następnie przedstawiona została populacja pacjentów, którzy poddani zostali badaniu, co moim zdaniem powinno znaleźć się w rozdziale **Metody.**

W rozdziale **Metody** doktorantka omówiła zastosowane szerokie metodologicznie badania w wyselekcjonowanej populacji pacjentów. A mianowicie :

- Ocena morfologiczna krwi obwodowej.
- Ocena subpopulacji monocytów i neutrofilów wykazujących ekspresję receptorów TLR2 i TLR4 we krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej.
- Ocena subpopulacji limfocytów $CD4^{+}$, $CD4^{+}CD25^{+}$ i $CD4^{+}CD25^{high}127^{low}$ we krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej.
- Ocena ekspresji osteopontyny wewnątrzkomórkowej w limfocytach T metodą cytometrii przepływowej,
- oraz metodykę zastosowana w analizie statystycznej.

Już sam zakres przeprowadzonych badań i wysoki poziom zastosowanej metodologii bardzo pozytywnie świadczy o ocenianym projekcie badawczym i ogromnym doświadczeniu doktorantki w zakresie badań w sferze immunologii doświadczalnej.

Następnie uzyskane wyniki badan poddano ocenie ststystycznej, której zasady zostały opisane w sposób szczegółowy aczkolwiek zabrakło mi w tym miejscu zgody Komisji Etycznej na przeprowadzenie projektu naukowo-badawczego.

Rozdział ten napisany został w sposób wzorowy i nie buzi żadnych istotnych zastrzeżeń.

W rozdziale Wyniki doktorantka szczegółowo przedstawiła wszystkie dane wynikające z przeprowadzonych badań w określonym przez doktorantkę zakresie, a mianowicie :

- Ocena ekspresji receptorów TLR2 i TL4 na monocytach i neutrofilach we krwi obwodowej u chorych grupy I z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry i w grupie kontrolnej.
- Ocena wybranych subpopulacji limfocytów CD4+ u chorych grupy I z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry i osób grupy kontrolnej.
- Ocena subpopulacji limfocytów T $CD4^+$ wytwarzających wewnątrzkomórkową formę osteopontyny we krwi chorych grupy II z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry i w grupie kontrolnej.
- Ocena wybranych subpopulacji limfocytów $CD4^+$ u chorych grupy II z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry i osób grupy kontrolnej.

Rozdział ten wywiera wrażenie wręcz imponujące dzięki skrupulatności badawczej doktorantki oraz umiejętności zaprezentowania w graficzny sposób uzyskanych wyników badań.

Rozdział **Dyskusja.**

W rozdziale tym doktorantka szczegółowo przedstawiła wszystkie dane wynikające z przeprowadzonych badań, które poddane zostały ocenie statystycznej przeprowadzonej w oparciu o starannie dobrane testy. Autorka

poddała krytycznej ocenie wyniki badań własnych w konfrontacji z piśmiennictwem polskim jak i światowym. Rozdział ten został napisany wzorowo i świadczy o dobrym rozeznaniu doktorantki w literaturze przedmiotu , w tym z ostatnich lat. **Omówienie wyników i dyskusja dowodzi dużej dojrzałości naukowej lek. Bacharewicz-Szczerbickiej .**

Rozdział Wnioski napisany został w sposób przejrzysty , i zawiera 8 jasno sprecyzowanych wniosków o bardzo wysokiej istotności merytorycznej, które doktorantka sformowała na podstawie uzyskanych wyników :

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.

Rozdział ten, podobnie zresztą jak poprzednie świadczy o wysokiego stopnia dojrzałości naukowo-badawczej doktorantki i moim zdaniem stanowi wzorowy sposób zaprezentowania obserwacji poczynionych w przeprowadzonym przez doktorantkę naukowym projekcie badawczym.

<u>Za szczególne zalety ocenianej pracy doktorskiej uznaję :</u>

1. Wybranie ciekawego i niezwykle istotnego tematu pracy doktorskiej mającego duże znaczenie zarówno naukowo-badawcze jak i praktyczne .
2. Autorka wykazała się bardzo dużą rzetelnością i pracowitością już na etapie planowania badania.
3. Uzyskanie ciekawych i bardzo wartościowych wyników stanowiących uzupełnienie obecnej wiedzy teoretycznej,

1. Praca ta stanowi mam nadzieję początek dalszych badań nad tym niezwykle interesującym tematem naukowo-badawczym.

W zakresie drobnych usterek rozmaitej natury (zamieszczonych w tekście mojej recenzji) , w tym edytorskiej praktycznie nie mam żadnych uwag krytycznych..

.

Moja ocena rozprawy doktorskiej **lek. med. Joanny Bacharewicz-Szczerbskiej** jest bardzo wysoka. Sposób przeprowadzenia zaplanowanych przez Doktorantkę badań, rzeczowa dyskusja i przedstawione wnioski świadczą o niezwykłej dojrzałości naukowej i badawczej Autorki oraz możliwości dalszego, samodzielnego już prowadzenia kolejnych badań naukowych. Moim zdaniem przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest dowodem na aktywny udział polskich naukowców w tym niezwykle fascynującym obszarze immunologii doświadczalnej i klinicznej.

W związku z powyższym mam zaszczyt przedłożyć Pani Dziekan i Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o przyjęcie rozprawy **lek. med. Joanny Bacharewicz-Szczerbskiej** za odpowiadającą wymogom stawianym pracom doktorskim, spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr65,poz 595, z póź.zm.) i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Dodatkowo ze względu na wyjątkową wartość merytoryczną pod względem nowatorskim, metodologicznym oraz naukowo-poznawczym, zwracam się do Pana Dziekana oraz Wysokiej Rady z prośbą o jej szczególne wyróżnienie.**

Czarnecka-Operacz

Prof.dr hab.med. Magdalena Czarnecka-Operacz