



**WOJSKOWY INSTYTUT MEDYCZNY  
CENTRALNY SZPITAL KLINICZNY MON**

ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa

**Klinika Dermatologiczna**

tel. +48 261 816 241; tel./fax: +48 261 817 187

Warszawa 18.05.2020

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lekarz Karoliny  
Malinowskiej**

W przedstawionej mi do recenzji rozprawie doktorskiej lek. Karoliny Malinowskiej pt.: „Wpływ fototerapii UVA1 na aktywność kliniczną i wybrane mediatory zapalenia u chorych na atopowe zapalenie skóry” postawiono sobie za ocenę skuteczności oraz wpływu fototerapii UVA1 na ekspresję mRNA genów i cytokin modulujących stan zapalny u chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS). Badania epidemiologiczne wskazują, że częstość występowania atopowego zapalenia skóry systematycznie wzrasta, dlatego istotne jest opracowanie skutecznych algorytmów leczenia. Dane piśmiennictwa podkreślają szybkie i korzystne efekty działania światła UVA1 w chorobach skóry, w patogenezie których istotną rolę odgrywają nacieki m.in. z limfocytów T. Efekt ten uzyskuje się dzięki wpływowi UVA1 na proces apoptozy komórek wydzielających cytokiny prozapalne, w tym komórki Langerhansa, fibroblasty i wspomniane wcześniej aktywowane komórki T. Istnieje ograniczona liczba doniesień naukowych oceniających skuteczności działania UVA1 w AZS. Przyczyną jest ograniczoną dostępność do sprzętu emitujących ten rodzaj promieniowania. W

Polsce fototerapia UVA1 jest metodą rzadko stosowaną ze względu na niewielką liczbę urządzeń oraz wysokie koszty ich utrzymania. Problemy te są przyczyną niewielkiej ilości publikacji naukowych dotyczących tego rodzaju leczenia. Wybór przez Doktorantkę tematu pracy uważam zatem za szczególnie trafny i zgodny z moimi oczekiwaniami. Warto zaznaczyć, że w dostępnym piśmiennictwie, pomimo aktualności tematu, nie ma wielu danych z codziennej praktyki klinicznej w populacji polskiej dotyczących tego zagadnienia. Podnosi to znacznie wartość poznawczą pracy lek. Karoliny Malinowskiej. Wyniki rozprawy mogą mieć również wymiar praktyczny związany z wprowadzeniem fototerapii z zastosowaniem średnich dawek UVA1 do schematów leczenia zaostrzeń w przebiegu atopowego zapalenia skóry. Świadczy to o umiejętności Doktorantki planowania badań naukowych.

Rozprawa ma klasyczny podział na rozdziały – wstęp, cele pracy, materiały i metodyka, wyniki, dyskusję oraz wnioski zgodnie z wymogami formalnymi zawartymi w Ustawie o Stopniach i Tytułach naukowych (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595). Na końcu rozprawy umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim, alfabetyczny wykaz zastosowanych skrótów oraz chronologiczny wykaz tabel i rycin. Zawiera łącznie 133 stron tekstu, 101 rycin i 8 tabel. W pracy znajdują się odniesienia do 119 pozycji piśmiennictwa.

Wstęp zawiera wyjaśnienie definicji oraz opis epidemiologii, obrazu klinicznego, obrazu histopatologicznego, kryteriów rozpoznania i patomechanizmu atopowego zapalenia skóry. Obejmuje także opis wybranych mediatorów biorących udział w patogenezie choroby tzn. TSLP, TARC, IL-4, -5, -8, -10, -13, -31, IFN- $\gamma$ , receptora dla chemokin CCR-4 i białek przeciwbakteryjnych. Dodatkowo zawiera szczegółowy opis roli fototerapii w leczeniu AZS. Rozdział pierwszy zawiera zatem istotną wiedzę stanowiącą podstawę teoretyczną podjętych badań.

Rozdział drugi zawiera prawidłowo sformułowane trzy cele pracy. W celu realizacji projektu badawczego lek. Karolina Malinowska przeprowadziła:

1. Określenie skuteczności fototerapii UVA1 u chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS) na podstawie oceny klinicznej pacjenta, zmiany wyniku wskaźnika SCORAD, zmniejszenia odczuwania świądu i poprawy jakości życia w oparciu o kwestionariusz DLQI.



2. Zbadanie wpływu fototerapii UVA1 na ekspresję mRNA genów dla molekuł tj. TSLP, TARC, IL-4, -5, -8, -10, -13, -31, IFN- $\gamma$ , CCR-4 i defenzyny  $\beta$  w skórze pacjentów z atopowym zapaleniem skóry.
3. Zbadanie korelacji pomiędzy poziomami mRNA dla cytokin tj. TSLP, TARC, IL-4, -5, -8, -10, -13, -31, IFN- $\gamma$ , CCR-4 i defenzyny  $\beta$  w skórze pacjentów z AZS przed i po fototerapii UVA1.

W rozdziale trzecim opisane zostały materiał i metodyka badań oraz analiza statystyczna. Grupę zakwalifikowaną do badania stanowiło 58 chorych (35 kobiet i 23 mężczyzn) na atopowe zapalenie skóry w fazie zaostrzenia leczonych w Klinice Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Rozpoznanie ustalono na podstawie kryteriów diagnostycznych Hanifina i Rajki. Aktywność AZS oceniono w oparciu o wskaźnik SCORAD (ang. *Scoring of Atopic Dermatitis*). Świąd oceniony był jako element wskaźnika SCORAD w oparciu o wizualną skalę analogową w skali od 1 do 10. Do oceny jakości życia wykorzystano kwestionariusz DLQI (ang. *Dermatology Life Quality Index*). Badanie ukończyło 36 chorych (20 kobiet i 16 mężczyzn) i w tej grupie zbadano wpływ terapii UVA1 na nasilenie choroby ocenione SCORAD, odczuwanie świądu i jakość życia. Fototerapia UVA1 była przeprowadzana przy użyciu lampy Medisun 24000 (Schulze & Bohm, Germany). U chorych wykonano 20 naświetlań całej skóry przez 5 kolejnych dni tygodnia (od poniedziałku do piątku). Wykorzystywano kolejne dawki UVA1: 10 J/cm<sup>2</sup>, 20 J/cm<sup>2</sup>, 30 J/cm<sup>2</sup>, a następnie 45 J/cm<sup>2</sup> do całkowitej liczby 20 naświetlań. Dawka skumulowana wynosiła 780 J/cm<sup>2</sup>. Chorzy w trakcie badania stosowali wyłącznie emolienty. U 25 pacjentów dwukrotnie tzn. przed i po ukończonym cyklu fototerapii pobrano wycinek skóry do oceny ekspresji mRNA. RNA izolowano przy użyciu mini kitów, a jego ilość określano za pomocą spektrometru. Cząsteczki mRNA powielano w reakcji PCR. Do ilościowego określenia mRNA dla poszczególnych genów oraz endogennej kontroli użyto standardowego zestawu polimerazy TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) i odpowiednich substratów. Wyniki przedstawiono jako  $\Delta C_t$ , co określa różnicę między progową liczbą docelowego genu a endogenną kontrolą. Opracowanie statystyczne wyników zostało wykonane z użyciem oprogramowania Statistica 13.3 (Statsoft, Polska). Metodyka badań jest zatem prawidłowo dobrana do postawionych celów pracy.

W rozdziale czwartym przedstawiono wyniki otrzymane w trakcie przeprowadzonych badań. Podzielony jest na trzy główne podrozdziały, w których opisano wyniki oceny

skuteczności fototerapii UVA1 w oparciu o zmianę wyniku wskaźnika SCORAD, zmniejszenia świądu i poprawy jakości życia, wyniki wpływ fototerapii UVA1 na poziom mRNA dla TSLP, TARC, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-31, INF- $\gamma$ , CCR-4 i defenzyny  $\beta$  w skórze oraz korelacje pomiędzy poziomami mRNA TSLP, TARC, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-31, INF- $\gamma$ , CCR-4 i defenzyny  $\beta$  w skórze pacjentów z AZS przed i po fototerapii. Doktorantka wykazała, istotną poprawę stanu klinicznego odzwierciedloną zmniejszeniem wartości SCORAD ( $p < 0,001$ ) i odczuwanego świądu ( $p < 0,001$ ) po naświetlaniu UVA1. Dodatkowo stwierdziła, oceniając DLQI, że terapia istotnie poprawia jakość życia u pacjentów z AZS ( $p < 0,001$ ). Lek. Karolina Malinowska, w trakcie przeprowadzonych badań wykazała, że UVA1 powoduje istotny wzrost poziomu mRNA dla TSLP, TARC, IL-4, IL-8 ( $p < 0,05$ ) i nie wpływa na poziom mRNA dla IL-5, IL-10, IL-13, IL-31, INF- $\gamma$ , CCR-4 i defenzyny  $\beta$  w skórze u chorych na AZS. W trakcie analizy wyników Doktorantka, wykazała również, szereg korelacji pomiędzy badanymi mediatorami biorącymi udział w reakcji zapalnej zarówno przed jak i po fototerapii UVA1. Wyniki oceny przedstawiła w postaci tabel i rycin z komentarzem w pełni umożliwiającym ich zrozumienie. W mojej opinii uzyskane w trakcie badań wyniki świadczą o rzetelnym zbieraniu oraz prawidłowej analizie danych przez Doktorantkę.

Rozdział piąty to dyskusja. W części tej w sposób rzetelny Doktorantka porównała wyniki badań własnych z dostępnymi w piśmiennictwie wynikami badań innych autorów. Lek. Karolina Malinowska wskazuje, na podstawie analizy badań własnych, że fototerapia jest skuteczną formą leczenia zaostrzeń i ciężkich postaci atopowego zapalenia skóry. Zwraca również uwagę, że metoda ta niesie małe ryzyko występowania działań niepożądanych. Informacje te są zgodne z doniesieniami innych autorów, a użycie przez Doktorantkę średnich dawek promieniowania w przeciwieństwie do rekomendowanych przez niektórych autorów wysokich stanowi istotny element poznawczy pracy. Na podstawie aktualnej wiedzy można założyć, że efekty działania promieniowania UVA1 powinny być m.in. związane z obniżeniem ekspresji IL-4 i IL-31 oraz z zwiększeniem ekspresji immunosupresyjnej IL-10. Badanie przeprowadzone przez Doktorantkę nie potwierdziło tego założenia. W tej części dysertacji lek. Karolina Malinowska w bardzo sprawny sposób, na podstawie dostępnych wyników badań uzyskanych przez innych autorów i aktualnej wiedzy wyjaśnia możliwe przyczyny tego stanu. Zwraca uwagę, że w badaniu własnym poprawa SCORAD, wiązała się ze wzrostem ekspresji mRNA dla interleukiny IL-4. Doktorantka zaznacza, że może być to związane z odmiennym celem terapeutycznym promieniowania UVA1, który nie dotyczy jedynie wpływu na poziom ekspresji IL-4, IL-10 i IL-31. Zaznacza również, że promieniowanie UVA1 może wpływać w

różny sposób na ekspresję określonych cytokin, w zależności od tego na jaki typ komórek oddziałuje. Stwierdza również, że keratynocyty nie są jedynym źródłem ich ekspresji. Analizując dane Doktorantka wskazuje, że wykazany w badaniach wzrost ekspresji mRNA dla IL-4 nie wydaje się być przypadkowy, jednak wyjaśnienie tego stanu wymaga dalszych badań. W dalszej części dyskusji lek. Karolina Malinowska szczegółowo omawia uzyskane wyniki ekspresji IL-10, IL-31 i pozostałych mediatorów tzn. TLSP, TARC, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IFN- $\gamma$ , CCR-4 oraz białek przeciwbakteryjnych. W mojej opinii istotną częścią dyskusji jest wyjaśnienie przez lek. Karolinę Malinowską ograniczeń pracy. Wśród ograniczeń doktorantka wymienia zarówno te związane z liczebnością grupy, jak również ograniczenia dobranej metodologii. Zalicza do nich m.in. brak porównawczej oceny ekspresji mRNA ze skóry niezmienionej, oceny ekspresji mRNA ze zmian przewlekłych oraz od zdrowych ochotników. Doktorantka wskazuje, że badania molekuł oceniające poziom białek mogłyby dostarczyć bardziej szczegółowych informacji niż porównanie różnic w poziomie ekspresji mRNA poszczególnych cytokin. Zauważa również, że uzyskane w badaniach rezultaty wskazują na ogólną ekspresję badanych molekuł w skórze bez możliwości oceny ich ekspresji przez poszczególne komórki biorące udział w reakcji zapalnej. Lek. Karolina Malinowska zwraca uwagę na brak oceny ekspresji badanych parametrów w surowicy oraz badań polimorfizm genów dla powyższych mediatorów. W tym miejscu należy zaznaczyć, że krytyczne podejście do oceny otrzymanych wyników świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i w konsekwencji podnosi wartość merytoryczną pracy. Wykazane elementy stanowią też w mojej doskonały plan dalszego rozwoju naukowego lek. Karoliny Malinowskiej.

Rozdział szósty zawiera trzy wnioski mające istotną wartość poznawczą oraz znaczenie w praktyce klinicznej tzn.:

1. Zastosowanie 20 naświetlań UVA1 przez 5 kolejnych dni tygodnia z wykorzystaniem średnich dawek: 10 J/cm<sup>2</sup>, 20J/cm<sup>2</sup>, 30 J/cm<sup>2</sup>, 45 J/cm<sup>2</sup> i kontynuacji dawki 45 J/cm<sup>2</sup>, czyli skumulowanej dawki 780 J/cm<sup>2</sup>, można uznać za skuteczną i bezpieczną metodę fototerapii chorych na atopowe zapalenie skóry, a zmniejszenie wyniku DLQI wskazuje na korzystny wpływ i poprawę jakości życia pacjentów uwarunkowaną chorobą skóry.



2. Występowanie w skórze ekspresji mRNA dla TSLP, TARC, IL-4, -5, -8, 10, -13, -31, IFN- $\gamma$ , CCR-4 i defenzyny  $\beta$  oraz istnienie korelacji między nimi potwierdza ich udział w patogenezie atopowego zapalenia skóry.
3. Stwierdzony po fototerapii UVA1 wzrost poziomu mRNA dla TSLP, TARC, IL-4, IL-8 w skórze u chorych na atopowe zapalenie skóry wskazuje, że odpowiedź immunologiczna typu Th1 oraz Th2 nie wykluczają się wzajemnie, a działanie kofaktorów, przestrzenne rozdzielanie skóry właściwej od naskórka, także typ komórki, mogą mieć związek z przebiegiem reakcji zapalnej.

W miejscu tym chciałbym zwrócić się do Doktorantki z pytaniem:

1. W jaki sposób kwalifikowano chorych do badania? Jakie czynniki decydowały o włączeniu chorych do leczenia UVA1? Czy mogą mieć one wpływ na wykazaną bardzo dobrą skuteczność terapii?
2. Czy wykluczenie elementów ocenianych przez pacjentów w ramach oceny wskaźnika SCORAD (objective SCORAD) wpłynęło by na wynik wykonanej analizy?
3. Badanie zaprojektowano jako jednoramienne bez grupy kontrolnej. W trakcie fototerapii UVA1 stosowana była terapia emolientowa. Czy może mieć ona wpływ na otrzymany wynik analizy skuteczności leczenia UVA1?

W podsumowaniu należy podkreślić, że wyniki pracy stanowią istotny wkład w uzupełnieniu wiedzy dotyczącej terapii, jak również pośrednio patomechanizmu atopowego zapalenia skóry. Zaznaczyć należy, że jej część ma istotną wartość poznawczą, związaną z zastosowaniem w badaniu schematem leczenia oraz oceną wyników jego użycia w populacji polskiej. W piśmiennictwie jest niewiele doniesień na temat ze względu na trudności w dostępie do tej metody leczenia w naszym kraju. W mojej opinii ocena skuteczności klinicznej fototerapii UVA1 to bardzo wartościowa część dysertacji, która znalazła swoje odzwierciedlenie we wnioskach. Uzyskane wyniki mogą dodatkowo w przyszłości wpłynąć na codzienną praktykę kliniczną m.in. poprzez wprowadzenie średnich dawek fototerapii UVA1 do leczenia zaostrzeń w przebiegu atopowego zapalenia skóry. Wartość poznawczą pracy podnosi ocena wpływu fototerapii UVA1 na ekspresję mediatorów zapalenia. Pomimo, iż

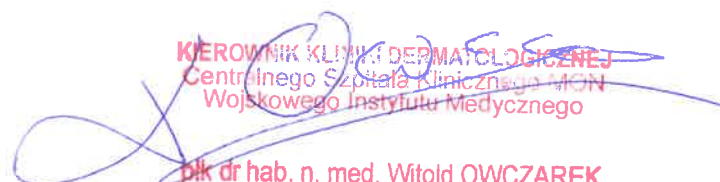
wykonana została w grupie 25 chorych, w mojej opinii ze względu na trudność wynikającą z konieczności uzyskania zgody na pobranie dwóch wycinków skóry w trakcie badania, stanowi cenny element pracy. Większość ocen według danych piśmiennictwa wykonywana jest na modelach w warunkach laboratoryjnych, dlatego uważam, że ocena tych elementów u chorych na atopowe zapalenie skóry było dużym wyzwaniem, którego podjęła się Doktorantka w trakcie realizacji badania

Zakres całej pracy tzn. zaplanowanie i wykonanie badań, prowadzona dyskusja i opracowane wnioski oraz dorobek naukowy doktorantki jest w mojej ocenie wystarczający dla uzyskania stopnia doktora nauk medycznych. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Karoliny Malinowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Witold Owczarek

WOJSKOWY INSTYTUT MEDYCZNY  
CSK MON - Kliniki, Oddziały, Zakłady - 01  
Klinika Dermatologiczna  
Kod cz. VII - 050 Kod cz. VIII - 4200  
04-141 Warszawa 44, ul. Szaserów 128  
Regon 015294457; NIP 113-23-93-221  
tel. 261 816 241, fax 261 817 187  
Kod identyfikacyjny 00000019182  
**07-R-8-00855-03-08**

KIEROWNIK KLINIKI DERMATOLOGICZNEJ  
Centralnego Szpitala Klinicznego MON  
Wojskowego Instytutu Medycznego  
  
plk dr hab. n. med. Witold OWCZAREK  
profesor nadzwyczajny WIM