



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Magdaleny Kutwin
pt. " Analiza markerów molekularnych w korelacji z przebiegiem klinicznym u
chorych na łuszczycę"

Łuszczycza jest częstą, dotyczącą 1-2% populacji świata, ogólnoustrojową chorobę zapalną, przewlekłą, charakteryzującą się licznymi nawrotami -powodującą ogromne obniżenie jakości życia chorych. Występuje w wielu postaciach klinicznych poczynając od postaci typowych zajmujących głównie skórę okolic wyprostnych kończyn, skórę głowy owłosionej po postaci zgięciowej, krostkowe, obejmujące stawy a także powodując rozległy stan zapalny skóry w postaci erytrodemii łuszczycowej. U większości pacjentów diagnoza łuszczycy stawiana jest na podstawie obrazu klinicznego. W przypadkach mniej typowych do potwierdzenia rozpoznania konieczne jest badanie histopatologiczne biopsji zmian skórnych. W ostatnich latach podstawowym narzędziem pomocnym w pracy dermatologa jest dermatoskop, który w wielu przypadkach pozwala w czasie rzeczywistym na potwierdzenie rozpoznania klinicznego lub precyzyjne wyznaczenie miejsca pobrania biopsji diagnostycznej. Uważa się, że łuszczycza jest chorobą o podłożu autoimmunizacyjnym, a wśród czynników wpływających na jej powstanie wymieniane są zarówno uwarunkowania genetyczne, jak i epigenetyczne. Łuszczycza jest następstwem zaburzeń immunologicznych, a komórkami mającymi istotne znaczenie w rozwoju zmian są nie tylko limfocyty T, ale również komórki dendrytyczne, keratynocyty oraz makrofagi, które wydzielają cytokiny prozapalne. Kluczową rolę w rozwoju zmian łuszczycowych odgrywa także odpowiedź komórkowa osi interleukina IL-12/Th1/IFN- γ , Th22/IL-22 oraz IL-23/Th17/IL-17. Szlaki te są aktywowane po inicjacji procesu zapalnego - u osoby predysponowanej genetycznie. Po zadziałaniu czynnika wyzwalającego dochodzi do interakcji między naiwnymi limfocytami T a mediatorami takimi jak IL-12, IL-23 i TNF- α wydzielanymi przez komórki prezentujące antygen (APC). Tak aktywowane limfocyty T rozpoczynają kaskadę wydzielania cytokin, które oddziałują na keratynocyty i komórki skóry właściwej prowadząc do wytworzenia blaszek łuszczycowych. Ostatnie kilka lat to intensywny rozwój nowoczesnych metod leczenia łuszczycy ciężkiej i umiarkowanej z zastosowaniem szerokiego wachlarza leków biologicznych hamujących powstawanie zmian łuszczycowych poprzez blokowanie działania cytokin, receptorów krążących i na powierzchni komórek - rola tych cząsteczek jest dobrze potwierdzona w patomechanizmie powstawania zmian łuszczycowych.

Temat pracy doktorskiej Doktorantki jest zatem bardzo aktualny, dotyczy poszukiwania najbardziej precyzyjnie dobranej terapii personalizowanej dla chorych z częstą, bardzo uciążliwą, nawrotową chorobą zapalną. Rozprawa doktorska opiera się na cyklu 3 powiązanych tematycznie prac opublikowanych w czasopiśmie o łącznym wskaźniku oddziaływania IF 7,922; MNiSW 280pkt - należy podkreślić, że we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem.

- 1) **Magdalena Kutwin, Monika Migdalska-Sęk, Ewa Brzeziańska-Lasota, Piotr Zelga, Anna Woźniacka.** „Analysis of molecular markers as IL-12, IL-22 and IFN- γ in correlation with a clinical course in patients with psoriasis”, *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 2020; 33: 635-47, doi: 10.13075/ijomeh.1896.01513
IF 1,843; MNiSW 70pkt.
- 2) **Magdalena Kutwin, Monika Migdalska-Sęk, Ewa Brzeziańska-Lasota, Piotr Zelga, Anna Woźniacka.** „An analysis of IL-10, IL-17A, IL-17RA, IL-23A and IL-23R expression and their correlation with clinical course in patients with psoriasis”, *Journal of Clinical Medicine*, 2021; 10: 5834, doi: 10.3390/jcm10245834
IF 4,242; MNiSW 140pkt.
- 3) **Magdalena Kutwin, Anna Woźniacka.** „Interleukins 20 and 8 – less widely known cytokines in psoriasis”, *Advances in Dermatology and Allergology*, 2022.

We wstępie do dwóch prac oryginalnych Autorka szczegółowo opisuje rolę poszczególnych badanych cząsteczek w etiopatogenezie łuszczycy, udawadniając doskonałą znajomość zaburzeń immunologicznych odgrywających kluczową rolę w powstawaniu zmian łuszczycowych, opiera się na najnowszym piśmiennictwie głównie anglojęzycznym. Szczegółowo opisuje procesy immunologiczne prowadzące do pobudzenia ekspresji genów i wydzielania cytokin, zapoczątkowania procesu zapalnego i wreszcie do rozwoju klinicznych objawów łuszczycy.

Celem badań przedstawionych w cyklu powiązanych tematycznie prac było poznanie molekularnych podstaw i mechanizmów procesu chorobowego oraz wzajemnych interakcji pomiędzy białkami indukującymi reakcję zapalną. Stąd też przedmiotem oceny był poziom ekspresji (RQ – *relative quantification*) wybranych genów docelowych uczestniczących w odpowiedzi komórkowej w przebiegu łuszczycy takich jak: geny dla *IL-8, IL-10, IL-12B, IL-17A, IL-17RA, IL-20, IL-22, IL-23A, IL-23R* oraz *IFN- γ* w tkance oraz krwi obwodowej. Przeprowadzona była również analiza korelacji poziomu ekspresji wybranych genów z obrazem klinicznym choroby. Do oceny nasilenia zmian skórnych Doktorantka używa powtarzalnej i odtwarzalnej, rekomendowanej przez PTD i inne towarzystwa dermatologiczne na świecie skali PASI. Wskaźnik PSI uwzględnia zarówno rozległość jak i nasilenie procesu łuszczycowego. Wykorzystuje także do oceny ciężkości łuszczycy BSA (Body

Surface Area), który określa procent powierzchni skóry dotkniętej zmianami oraz DLQI (Dermatology Life Quality Index)- kwestionariusz, który ocenia wpływ łuszczycy na jakość życia pacjenta w ostatnim tygodniu.

W pierwszej publikacji

„Analysis of molecular markers as IL-12, IL-22 and IFN- γ in correlation with a clinical course in patients with psoriasis”

Doktorantka wraz z Zespołem analizowała względny poziom ekspresji genów (RQ) dla *IL-12B*, *IL-22* i *IFN- γ* w limfocytach T regulatorowych (CD4/CD25) z krwi obwodowej oraz w bioptatach skóry. Wyizolowane z pobranych komórek RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji by następnie ocenić poziom ekspresji wybranych genów za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR - *real-time polymerase chain reaction*) i przedstawić jako wartość RQ w stosunku do genu referencyjnego *GAPDH*. Następnie oceniana była korelacja uzyskanych danych z przebiegiem klinicznym łuszczycy z zastosowaniem wybranych skal (PASI, BSA, DLQI).

* Wykazano, że w materiale biologicznym pochodzącym ze skóry poziom ekspresji genów dla *IL-12B*, *IL-22* oraz *IFN- γ* w grupie pacjentów z łuszczycą był istotnie wyższy. *Wskazuje to na ważną rolę tych cytokin w etiopatogenezie łuszczycy.*

* Dodatkowo stwierdzono, że poziom ekspresji genu dla *IL-12B* korelował z klinicznymi parametrami oceny nasilenia łuszczycy PASI i BSA. Poziomy ekspresji *IL-12B* były wyższe u pacjentów z łuszczycą umiarkowaną do ciężkiej (PASI > 10) niż u pacjentów z łagodną postacią choroby (PASI \leq 10). Podobną zależność dla *IL-12B* stwierdzono również pomiędzy rozległością zmian skórnych. Istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji został zaobserwowany w grupie pacjentów z BSA > 25 w porównaniu do grupy chorych z BSA \leq 25.

* Nie stwierdzono korelacji między poziomem ekspresji genu dla *IL-22* oraz *IFN- γ* a parametrami oceniającymi nasilenie łuszczycy takimi jak PASI i BSA. Jednakże zauważono, że poziomy ekspresji dwóch wyżej wymienionych genów były wyższe w grupie z umiarkowaną i ciężką postacią choroby (PASI > 10 i BSA > 20 dla *IL-22* oraz PASI > 10 dla *IFN- γ*). *Doktorantka uważa, że wyniki mogą sugerować, że IL-22 oraz IFN- γ mają większy wpływ na rozwój łuszczycy aniżeli na nasilenie procesu chorobowego.*

* Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomach ekspresji żadnego z wybranych genów u pacjentów z DLQI \leq 10 i > 10. *. DLQI jest subiektywnym parametrem, nie zawsze bezpośrednio*

powiązanych z nasileniem procesu chorobowego. Istnieją również inne czynniki takie jak uwarunkowania psychospołeczne, sytuacja społeczno-ekonomiczna pacjenta, emocjonalne tło lub indywidualna wrażliwość chorego, które najprawdopodobniej wpływają na ocenę jakości życia.

******Natomiast poziom względnej ekspresji genu dla *IFN- γ* oceniany w limfocytach T regulatorowych (CD4/CD25) był podwyższony zarówno w grupie chorych na łuszczycę, jak i w grupie kontrolnej, jednak bez istotności statystycznej i bez istotnej korelacji z PASI, BSA lub DLQI. *Doktorantka sugeruje, że może to być wynikiem faktu, że IFN- γ nie jest swoistym markerem procesu zapalnego w chorobach autoimmunologicznych- może być również uwalniany jako mediator w odpowiedzi na patogeny takie jak wirusy, pasożyty i bakterie oraz gdy obecne są komórki nowotworowe.*

******Wartość RQ genu dla *IL-12B* i *IL-22* była poniżej poziomu wykrywalności w obu grupach. *W ocenie Doktorantki brak ekspresji genów dla IL-12B i IL-22 w komórkach CD4/CD25, a obecność ich ekspresji w skórze może świadczyć o ich miejscowym a nie ogólnoustrojowym wpływie na rozwój procesu zapalnego.*

Wykazanie znacznego wzrostu poziomu ekspresji genów dla IL-12B, IL-22 i IFN- γ w skórze pacjentów z łuszczycą potwierdza, że kodowane przez nie cytokiny odgrywają istotną rolę w rozwoju i/lub utrzymywaniu się zmian łuszczycowych. Potwierdzenie nadekspresji badanych genów u chorych na łuszczycę może przyczynić się w przyszłości do opracowywania terapii celowanych, które wydają się nie tylko bardziej skuteczne, ale również obdarzone mniejszym ryzykiem działań niepożądanych.

W kolejnej publikacji poddano analizie poziom ekspresji (RQ) genów dla *IL-10*, *IL-17A*, *IL-17RA*, *IL-23A* i *IL-23R*. „An analysis of IL-10, IL-17A, IL-17RA, IL-23A and IL-23R expression and their correlation with clinical course in patients with psoriasis

Podobnie jak w poprzedniej pracy w celu przeprowadzenia izolacji RNA i reakcji odwrotnej transkrypcji pobierano bioptaty skóry i krew obwodową od chorych na łuszczycę oraz od zdrowych osób z grupy kontrolnej. Uzyskany materiał został poddany RT-PCR dla wybranych genów, a wyniki przedstawiono jako wartość RQ. Ponadto przeprowadzono analizę korelacji poziomu ekspresji badanych genów z przebiegiem klinicznym choroby ocenianym wskaźnikami PASI, BSA i DLQI.

* Nie stwierdzono istotnych zależności między poziomem ekspresji genu dla *IL-10* a wartościami PASI, BSA i DLQI u wszystkich pacjentów, wyższą ekspresję *IL-10* zaobserwowano w grupach z BSA \leq 20 i DLQI \leq 10. *Potwierdza to fakt, że IL-10 może mieć wpływ na proces regresji zmian łuszczycowych, a jej egzogenna podaż może stanowić alternatywną formę leczenia.*

*Badania wykazały również istotnie wyższą ekspresję genu dla *IL-17A* w zmianach łuszczycowych. Wydaje się więc, że *IL-17A* bierze istotny udział w patogenezie łuszczycy poprzez wzmacnianie oraz podtrzymywanie przewlekłej odpowiedzi zapalnej w skórze.

*uzyskano odwrotną zależność dla *IL-17RA* – ekspresja genu dla tego receptora była zmniejszona w blaszkach łuszczycowych, a podwyższona u osób zdrowych. Potwierdza to tezę, że *IL-17A* do transmisji sygnału wymaga całego kompleksu składającego się nie tylko z *IL-17RA*, ale również z *IL-17RC*. Jednakże istotne korelacje między wartościami PASI, BSA i DLQI a poziomem ekspresji genów dla tych dwóch białek nie zostały stwierdzone. *Wyniki przeprowadzonych analiz wyjaśniają podstawy skuteczności terapii biologicznych ukierunkowanych na IL-17A i/lub IL-17RA.*

*Ekspresja genu dla *IL-23A* była obniżona w grupie chorych na łuszczycę oraz w grupie kontrolnej. Może to wynikać z faktu, że ekspresja podjednostki p40, która jest wspólna dla *IL-23* i *IL-12*, może być kluczowym czynnikiem w rozwoju i utrzymaniu łuszczycowych zmian skórnych. Znalazło to odzwierciedlenie w publikacji numer 1, w której opisano podwyższony poziom ekspresji genu *IL-12B* w blaszkach łuszczycowych. Z drugiej strony dane z literatury wskazują, że nadekspresja p40 może być głównie zależna od genu dla *IL-23*, a nie jak wcześniej opisywano genu dla *IL-12*. *Nie ma jednak wątpliwości, że terapia oparta na przeciwciałach monoklonalnych skierowanych przeciwko podjednostce p40, których celem jest zarówno IL-12, jak i IL-23, przyniesie poprawę kliniczną u chorych na łuszczycę.*

* W przeprowadzonych badaniach wykazano, że ekspresja genu dla *IL-23A* była istotnie wyższa u pacjentów z łuszczycą o nasileniu umiarkowanym do ciężkiego (PASI > 10) w stosunku do pacjentów z łagodną postacią choroby (PASI ≤ 10).

*Stwierdzono nadekspresję genu dla *IL-23R* w bioptatach skóry pochodzących zarówno od pacjentów chorujących na łuszczycę, jak i od osób zdrowych z grupy kontrolnej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wzrost ten był wyraźnie wyższy w grupie pacjentów z łuszczycą. Z drugiej strony zaobserwowano spadek ekspresji genu dla *IL-23R* wraz ze wzrostem BSA. Ujemna korelacja między wartością RQ genu dla *IL-23R* a BSA wynikać może z faktu, że BSA jest wskaźnikiem oceniającym tylko powierzchnię skóry zajętej przez zmiany chorobowe, bez uwzględnienia nasilenia rumienia, nacieku i łuski

**Wartości RQ w limfocytach T-regulatorowych CD4/CD25 genu dla *IL-10*, *IL-17A* i *IL-23R* były poniżej poziomu wykrywalności w obu badanych grupach.

****** Z kolei ekspresja genu dla *IL-17RA* i *IL-23A* była podwyższona w stosunku do genu referencyjnego w limfocytach krwi obwodowej zarówno u chorych z łuszczycą, jak i osób zdrowych. *Brak ekspresji genu dla IL-10 w komórkach CD4/CD25 u pacjentów potwierdza przeciwłuszczycowe działanie tej immunoregulującej cytokiny. Z kolei obecność ekspresji genu dla IL-17A w skórze, ale nie w limfocytach T-regulatorowych krwi obwodowej, może wskazywać na miejscowe, a nie ogólnoustrojowe zaangażowanie jej w proces zapalny i etiopatogenezę łuszczycy.*

Przeprowadzone badania potwierdzają, że zależne od analizowanych genów cytokiny IL-10, IL-17 i IL-23 nie tylko mają kluczowe znaczenie w rozwoju choroby, ale stanowią ważny cel terapeutyczny, istotny w wyborze leczenia celowanego, tj. najbardziej efektywnego dla indywidualnego pacjenta.

Trzecia publikacja Doktorantki i „*Interleukins 20 and 8 – less widely known cytokines in psoriasis*” ma charakter przeglądowy, przeprowadzono systematyczny przegląd publikacji oceniających poziom ekspresji genów dla *IL-20* i *IL-8* oraz kodowanych przez nie cytokin w aspekcie ich patogennej roli w rozwoju łuszczycy i potencjalnych możliwości terapeutycznych. Mimo, że nie są to mediatory pozostające w głównym nurcie immunomechanizmów w tej dermatozie, to jednak wielu autorów uważa, że mogą odgrywać istotną rolę w utrzymywaniu aktywności choroby. Autorka zauważa, że rzadko opisywano zależność między poziomem IL-8 w skórze a nasileniem choroby, W jednym z cytowanych badań odnotowano dodatnią korelację między tymi parametrami. Również w surowicy chorych na łuszczycę stwierdzono podwyższone poziomy stężenia IL-8, ale bez jednoznacznej korelacji z PASI. Wykazano także, że niektóre konwencjonalne metody terapeutyczne (miejscowe analogi witaminy D, cyklosporyna i takrolimus administrowane doustnie) oraz leki biologiczne (ustekinumab, infliksymab, etanercept i rekombinowana ludzka IL-4) obniżają ekspresję mRNA IL-8 i stężenie IL-8 w skórze chorych na łuszczycę. Stąd też wydaje się, że IL-8 i jej receptor mogą być obiecującymi kierunkiem terapeutycznym w łuszczycy.

Wg Doktorantki cytowane wyniki badań potwierdzają pogląd, że IL-20, IL-8 i ich receptory odgrywają bezpośrednią lub pośrednią rolę w etiopatogenezie łuszczycy. Mimo, że IL-20 i IL-8 pozostają w cieniu ogólnoustrojowej burzy cytokinowej, to jednak przeprowadzone dotychczas badania wydają się uzasadniać zarówno ich znaczenie w rozwoju, utrzymywaniu się zmian łuszczycowych, jak i ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne.

Każda z cytowanych publikacji została już zrecenzowana przez grono powołanych Ekspertów, wszystkie prace zostały przyjęte i opublikowane w liczących się naukowych impaktowanych czasopismach dermatologicznych. Chcę zwrócić uwagę na bardzo dojrzałe, wyważone komentarze Doktorantki do uzyskanych wyników badań. Każdy uzyskany przez Autorkę prac wynik jest opatrzony głęboko

przemyślanym komentarzem. Pozwoliłam sobie jako Recenzent zwrócić na nie uwagę poprzez przedstawienie części z nich w recenzji. Wszystkie publikacje powstały pod merytoryczną opieką i w Zespołach pracujących z Panią Promotor Profesor Anną Woźniacką; dojrzałość pracy, logiczna interpretacja wyników badań potwierdzają bardzo dobrą współpracę z Panią Promotor, która jest doskonałym dydaktykiem i naukowcem. Bardzo drobna uwaga dotyczy faktu, że język angielski publikacji jest bardzo dobry, natomiast w polskim omówieniu nie zawsze komentarze są przedstawione dosłownie, nie umniejsza to wartości cyklu publikacji- które uważam za bardzo dobre. Wiele wyników badań Doktorantki może przynieść konkretne korzyści praktyczne dla pacjentów z łuszczycą u których planowana jest terapia antycytokinowa- terapia spersonalizowana to ważny kierunek rozwoju medycyny.

Na podstawie powyżej przedstawionych danych, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona mi do oceny **rozprawa doktorska lekarz medycyny Magdaleny Kutwin pt."Analiza markerów molekularnych w korelacji z przebiegiem klinicznym u chorych na łuszczycę** przygotowana pod opieką promotorską **Prof. dr hab. med. Anny Woźniackiej** spełnia warunki określone w art.13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 z późniejszymi zmianami (Dz.U.nr.65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art.179 ust.1 z dnia 30.01.2018w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.z 2018r.poz.1669 z póź.zm.)

Mam więc zaszczyt przedłożyć Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Łódzkiego Uniwersytetu Medycznego moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej lek.med. Magdaleny Kutwin wraz z wnioskiem o dopuszczenie lekarz medycyny Magdaleny Kutwin do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo na podstawie przedstawionego powyżej uzasadnienia wnioskuje o **wyróżnienie** pracy.

10.VI.2022
KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Dermatologii GM UJ
w Krakowie
Prof. dr hab./ped. Anna Wojaś-Pełc