



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii

Kierownik : Prof. dr hab. n.med. Jacek Szepietowski

Ul. Chałubińskiego 1, 50-368 Wrocław

Tel. +4871/327-09-41 Fax. +4871/327-09-42

e-mail: [dermw@um.wroc.pl](mailto:dermw@um.wroc.pl) <http://www.derm.um.wroc.pl>

Wrocław, 07.01.2021

## OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

### **Wandy Niepiekło-Miniewskiej pt. „Badanie związku genów KIR i HLA oraz maszynerii prezentującej antygen z podatnością i przebiegiem atopowego zapalenia skóry”**

Atopowe zapalenie skóry to przewlekła, nawrotowa dermataza zapalna, która dotyka około jedną piątą całej ludzkości. W ostatnich trzech dekadach znacznie wzrasta częstość występowania tej choroby, szczególnie w krajach uprzemysłowionych. Atopowe zapalenie skóry u około 50% chorych, rozpoczyna się wcześniej już w okresie niemowlęctwa, następnie objawy chorobowe występują u dzieci w okresie przedszkolnym, szkolnym i u osób dorosłych. Skórne objawy choroby to ogniska wyprysku w fazie ostrej podostrej lub przewlekłej przebiegające ze stanem zapalnym skóry. Lokalizacja wykwitów chorobowych w przebiegu AZS jest charakterystyczna dla poszczególnych grup wiekowych. W przypadkach bardzo dużego nasilenia choroby dochodzi do zajęcia całej skóry. Chorzy skarżą się na intensywny świąd i zaburzenia snu. Choroba prowadzi do znacznego obniżenia jakości życia. U chorych na AZS występuje ryzyko wystąpienia innych chorób atopowych takich jak astma, alergiczny nieżyt nosa, alergiczne zapalenie spojówek. Patogeneza AZS jest złożona i nie do końca poznana. W patogenezie choroby rolę odgrywają czynniki środowiskowe oraz czynniki genetyczne związane z równo z dysfunkcją bariery skórnej jak i odpowiedzi immunologicznej. Czynniki środowiskowe związane są ze współczesnym stylem życia, zanieczyszczeniem powietrza, czynnikami klimatycznymi oraz infekcjami wpływają na zmiany epigenetyczne sprzyjające rozwojowi AZS. O dużej roli czynników genetycznych świadczą wyniki badań epidemiologicznych wskazujące na 50% ryzyko wystąpienia AZS u dziecka gdy u obojga rodziców występuje atopia. Stosowanie najnowszych narzędzi badań

PAN - Instytut Immunologii  
Wpł. dnia .....07-01-2021.....  
L.dz. ....861.....

genetycznych jak genomika, analiza sprzężeń i badania powiązań umożliwiają bardziej dogłębne określenie czynników genetycznych wpływających na rozwój AZS. Wykazano że znaczącą rolę w patogenezie choroby odgrywiają geny zlokalizowane na chromosomie 1q21 w regionie zawierającym kompleks różnicowania naskórka. Genetycznie uwarunkowane nieprawidłowości bariery naskórkowej, a w szczególności defekt genu kodującego filagrynę, białka występującego w warstwie rogowej naskórka, odgrywa znaczącą rolę w patogenezie AZS. W ostatnich latach dzięki możliwości zastosowania nowoczesnych metod badań asocjacyjnych całego genomu GWAS (genom-wide association study) rozpoczęto dalsze poszukiwania genów mogących brać udział w patogenezie AZS. Stwierdzono że poza genami związanymi z funkcją bariery skórnej są to także geny odpowiadające za wrodzoną i nabytą odpowiedź immunologiczną, związane z funkcją cytokin, limfocytów T regulatorowych, metabolizmu witaminy D oraz czynnikiem wzrostu nerwów. W AZS obserwuje się liczne zaburzenia immunologiczne w zakresie odpowiedzi typu humoralnego i komórkowego, oraz odpowiedzi immunologicznej nieswoistej: chemotaksji, fagocytozy i funkcji komórek NK.

W przebiegu AZS obserwuje się dwufazowy wzór aktywacji limfocytów z przesunięciem w kierunku odpowiedzi Th2 w początkowej fazie choroby i w kierunku Th1/Th0 w przewlekłej fazie choroby. Ostatnio zwraca się uwagę na limfocyty T o funkcji regulatorowej (Treg) o fenotypie  $CD4^{+}25^{+}$  z mutacją czynnika transkrypcyjnego FoxP3, które wpływają na zwiększoną produkcję IgE u pacjentów z chorobami zapalnymi skóry i alergią pokarmową. W patogenezie choroby odgrywa rolę również zdolność limfocytów Treg do różnicowania się w komórki Th1, Th17 lub Th2 pod wpływem specyficznych cytokin i mechanizmów epigenetycznych. Badania z ostatnich lat wskazują również na udział Limfocytów Th17 i Th22 w patogenezie AZS. Th22 i IL22 odpowiada za osłabienie bariery skórnej i hiperplazję naskórka. Wiadomo również, że w patogenezie AZS ważną rolę odgrywiają komórki dendrytyczne naskórka: komórki Langerhansa oraz zapalne komórki dendrytyczne naskórka. Komórki te na swojej powierzchni posiadają receptor FcεR1 o wysokim powinowactwie do IgE. W ten sposób komórki Langerhansa mogą po kontakcie z wieloma alergenami przenikającymi do naskórka chorych z atopowym zapaleniem skóry, przetwarzać je w kontekście antygenów MHC klasy II. W kolejnym etapie antygeny te są prezentowane przez komórki dendrytyczne naiwnym limfocytom T. W zmianach skórnych u pacjentów z AZS znajdowano również komórki NK występujące w bliskim kontakcie z komórkami dendrytycznym. Stwierdzono również, że świeżo wyizolowane z krwi pacjentów z alergią na wiele alergenów, komórki NK spontanicznie wydzielają znacznie większe ilości IL4, IL5, IL13 i IFN $\gamma$  w porównaniu do osób zdrowych. Wyniki badań wskazują na to że komórki

NK uczestniczą w regulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez modulację funkcji komórek dendrytycznych, ale ich rola w AZS nie została do końca poznana. Najważniejszymi receptorami hamującymi lub pobudzającymi aktywność tych komórek są cząsteczki KIR, których ligandami są cząsteczki HLA klasy I. Proces prezentacji antygenów w postaci peptydów związanych cząsteczkami HLA klasy I zależy od działania białek wchodzących w skład tzw. maszyny prezentacji antygenów (AMP). Aktywność tych białek a co za tym idzie skuteczność procesu prezentacji antygenów jest zależny od polimorfizmu genów AMP: LMP2, LMP7, TAP1, TAP2, ERAP1, ERAP2. Do chwili obecnej polimorfizm wyżej wymienionych genów nie był szeroko badany w AZS. Doktorantka podjęła się przebadania polimorfizmu wielu genów cząsteczek KIR regulujących funkcję komórek NK, cząsteczek HLA klasy I, białek wchodzących w skład tzw. maszyny prezentacji antygenów u pacjentów z AZS oraz ich wpływ na podatność na AZS i na przebieg choroby. Temat rozprawy doktorskiej uważam za trafny, doskonale wpisujący się w aktualny nurt współczesnych badań dotyczących nie do końca poznanej patogenezy AZS.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Wandy Niepiekło-Miniewskiej obejmuje 152 strony oprawionego wydruku komputerowego tym 46 tabel, 26 rycin, 225 pozycji piśmiennictwa. Piśmiennictwo pochodzi z ostatnich lat. Układ pracy jest typowy dla rozprawy doktorskiej: zawiera wykaz skrótów, wstęp, cele pracy, materiał i metody badawcze, wyniki, dyskusję, wnioski oraz streszczenie i piśmiennictwo.

Wprowadzenie rozprawy doktorskiej składa się z siedmiu rozdziałów. W oparciu o dane z najnowszego piśmiennictwa światowego i rodzimego, Doktorantka w sposób przejrzysty i zwięzły omawia epidemiologię, patogenezę, obraz kliniczny, atopowego zapalenia skóry. Zwraca uwagę swobodne i przejrzyste omówienie czynników środowiskowych, genetycznych oraz immunologicznych w patogenezie AZS, przy czym zwraca uwagę na fakt, że jak dotąd nie została dokładnie zbadana rola komórek NK w rozwoju AZS

W drugiej części wstępu autorka szczegółowo opisała komórki NK i ich rolę w procesach immunologicznych oraz receptory znajdujące się na ich powierzchni a szczególnie receptory KIR, następnie ligandy tych receptorów czyli antygeny głównego układu zgodności tkankowej HLA klasy I. Opisała również organizacje genów MHC wśród których znajdują się geny cząsteczek HLA. Zwróciła uwagę na występowaniu wśród genów zgodności tkankowej zjawiska niezrównoważenia sprzężeń (LD) polegające na częstszym występowaniu różnych loci razem w blokach zwanych haplotypami niż wynikałoby to z przypadkowego, niezależnego ich działania. Następnie dokładnie przedstawiła maszynę prezentacji

antygeny (AMP) w skład której wchodzi białka, których aktywność jest niezbędna do prawidłowego przebiegu procesu prezentacji antygeny. Doktorantka opisała szczegółowo wybrane cząsteczki maszynerii prezentacji antygeny: LAMP2, LAMP7 (low molecular protein) będące komponentami proteasomu i tną białka na peptydy o większym powinowactwem do cząsteczki MHC klasy I; TAP1, TAP2 (Transporter associated with Antigen Presenting), które dostarczają odpowiednie peptydy dla cząsteczek HLA klasy I; ERAP1, ERAP2 (endoplasmic reticulum aminopeptidase) których główna funkcja polega na przycinaniu N-końcowych fragmentów peptydów prezentowanych w kontekście MHC klasy I. Doktorantka przedstawiła także związek aminopeptydaz ERAP i peptydów cząsteczek HLA klasy I z pewnymi chorobami, wśród których najlepiej przebadany jest związek cząsteczki HLA-B27 z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa. We wstępie znalazły się 4 tabele i 6 rycin, które były pomocne w przedstawianiu omawianych problemów. Wstęp jest napisany w sposób jasny, wyczerpujący i dokumentuje bardzo dużą wiedzę autorki z zakresu genetyki i immunologii. Całość wstępu stanowi bardzo dobre, w pełni wyczerpujące wprowadzenie do badań własnych Doktorantki.

Założenia i cele pracy zostały przedstawione w sposób jasny. Doktorantka postanowiła przeprowadzić:

- Porównanie częstości występowania genów KIR w grupie chorych na AZS i w grupie kontrolnej
- Porównanie rozkładu części epitopów HLA-C (C1 i C2) oraz epitopów HLA-B i HLA-A Bw4 (ligandów, odpowiednio dwu- i trójdomenowych cząsteczek KIR) w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.
- Porównanie częstości występowania alleli HLA locus C u chorych na AZS i w grupie kontrolnej
- Porównanie częstości występowania polimorficznych wariantów genów maszynerii prezentacji antygeny (AMP): LAMP2, LAMP7, TAP1, TAP2, ERAP1, ERAP2 w grupie chorych na AZS i w grupie kontrolnej.
- Analizę oddziaływań pomiędzy wariantami polimorficznymi genów maszynerii prezentującej antygen.
- Analizę związku genów KIR, HLA, LAMP2, LAMP7, TAP1, TAP2, ERAP1, ERAP2 z przebiegiem AZS i wybranymi danymi klinicznymi

- Analizę oddziaływań pomiędzy allelami genów KIR, ich ligandami HLA-C (grupa C1 C2) oraz allelami genów HLA-C i wariantami polimorficznymi genów maszynerii prezentującej antygen.
- Badanie funkcji biologicznej polimorfizmów pojedynczego nukleotydu związanych z podatnością na AZS.

Postawienie tak ambitnych celów rozprawy doktorskiej i podjęcie się zbadania wielu elementów genetycznego podłoża AZS wytypowanych przez najnowocześniejsze metody badań asocjacyjnych całego genomu GWAS (genom-wide association study) świadczy o dużej wnikliwości badawczej doktorantki.

Przedstawione przez Doktorantkę cele badawcze zostały w pełni zrealizowane w dalszych częściach rozprawy doktorskiej, co świadczy o dużej umiejętności planowania badań naukowych.

Badaniami objęto 441 pacjentów z AZS. Analizie genów KIR i ich ligandów poddano dwie grupy pacjentów z AZS. W pierwszej grupie było 240 chorych (142 kobiety i 98 mężczyzn w wieku od 2 do 62 lat) w drugiej grupie 201 pacjentów (110 kobiet i 91 mężczyzn w wieku od 2 do 62 lat). Genotypowanie alleli HLA-C przeprowadzono dla 293 a badanie polimorfizmów genów maszynerii prezentacji antygeny dla 318 pacjentów. Grupę kontrolną stanowiło 570 niespokrewnionych osób zdrowych (332 kobiety i 238 mężczyzn w wieku od 19 do 83 lat)

Do oceny nasilenia zmian chorobowych zastosowano skalę SCORAD. W badanej grupie średnia wartość SCORAD wynosiła 39,7 a zakres wartości SCORAD wynosił od 14 do 93 punktów. Ponadto zbierano informacja na temat wieku, w którym rozpoczęła się choroba oraz występowania atopowych chorób współistniejących takich jak astma, alergiczny nieżyt nosa i alergiczna zapalenie spojówek.

Zastosowana metodologia badań molekularnych odpowiada obecnym standardom prowadzenia tego rodzaju badań i nie budzi zastrzeżeń. Metodyka tych badań została opisana bardzo skrupulatnie i przejrzystie.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono starannie z dobrze wyselekcjonowanymi testami. Podnosi to rangę pracy i uwiarygodnia prezentowane przez Doktorantkę w dalszej części rozprawy własne wyniki badań.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały opracowane niezwykle starannie i sumiennie. Zostały opisane oraz przedstawione w postaci czytelnych 28 tabel i 14 rycin.

Uderza mnogość dokonanych analiz, poszukiwania wzajemnych korelacji, które są odzwierciedleniem dojrzałości naukowej mgr Wandy Niepiekło-Miniewskiej. Rozdział

„Wyniki” stanowi bardzo wartościową część ocenianej rozprawy. Badając wnikliwie rolę komórek NK w rozwoju AZS Doktorantka wykazała ochronne działanie genu KIR2DS1 u pacjentów z tą chorobą. Na podkreślenie zasługuje fakt że są to pierwsze, nowatorskie doniesienia na temat związku cząsteczek KIR i kodujących je genów z atopowym zapaleniem skóry. Doktorantka przytoczyła informacje na temat badań wskazujących na odwrotny wpływ genu KIR2DS1 u chorych z łuszczycą gdzie obserwuje się przeciwną rolę tego genu i jego związek z podatnością na łuszczycę. Doktorantka podjęła się ciekawego i trafnego wyjaśnienia tego zjawiska.

Doktorantka nie wykazała różnic w częstości występowania epitopów HLA-C (C1 i C2) oraz HLA-B i HLA-A zawierających motyw Bw4 u chorych na AZS i u osób zdrowych. Stwierdziła natomiast częstsze występowanie epitopu C1 u chorych, u których choroba rozpoczęła się w młodszym wieku, natomiast u chorych u których chorobą zdiagnozowano w późniejszym wieku częstsze występowanie epitopu HLA-B Bw4 (Thr80). Jest to pierwsze doniesienie na temat związku genów KIR i HLA z wiekiem zachorowania na AZS.

Ciekawą obserwacją było również to, że osoby nie posiadające allelu HLA-C\*05 miały dwukrotnie mniejsze ryzyko zachorowania na AZS niż osoby posiadające ten allel. Allel HLA-C\*07 dwukrotnie zwiększał ryzyko zachorowania na AZS u pacjentów pozytywnych pod względem KIR2DS1.

Ciekawe wyniki Doktorantka uzyskała badając polimorfizmy pojedynczych nukleotydów genów aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej ERAP 1 i ERAP 2. Badania wykazały, że rs26618 w genie ERAP1 jest związany z ryzykiem zachorowania na AZS. Osoby będące nosicielami allelu C (C/T i C/C) w porównaniu z homozygotami T/T i dodatkowo ujemnym wynikiem KIR2DS1 miały większe ryzyko zachorowania na AZS. Doktorantka wykazała także synergistyczny efekt pewnych genotypów ERAP1 i ERAP2. Osoby z genotypem ERAP2 rs2248374\*A/A – ERAP1 rs26618\*C/C miały ponad trzykrotnie większą szansę zachorowania na AZS niż osoby z pozostałymi genotypami. Doktorantka wykazała, że warianty polimorficzne w genach KIR, HLA, LMP2, TAP1, ERAP1 miały wpływ na wiek diagnozy, ciężkość przebiegu choroby, oraz miały związek z atopowymi chorobami współistniejącymi.

Dyskusja, będąca kolejnym rozdziałem rozprawy doktorskiej jest obszerna. Doktorantka wykazała, że dobrze przeanalizowała dostępne piśmiennictwo, a także potrafi krytycznie interpretować własne wyniki w świetle innych doniesień. Omówienie jest wyczerpujące, dowodzi dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Całość rozprawy jest podsumowana wnioskiem ogólnym i sześcioma wnioskami szczegółowymi. Wnioski są logiczne, uważnie przemyślane, konsekwentnie wypływają z przeprowadzonych badań. Według mojej oceny, wszystkie wnioski są trafne i ważne oraz stanowią znaczącą wartość praktyczną. Słuszne i nowatorskie jest stwierdzenie doktorantki na podstawie przeprowadzonych badań własnych, że w patogenezie AZS odgrywają rolę genetyczne uwarunkowania procesów immunologicznych związanych z aktywnością komórek NK. Celnie zostały wytypowane geny cząsteczek KIR, HLA klasy I, białek wchodzących w skład tzw. maszynerii prezentacji antygeny jako czynników ryzyka wystąpienia AZS

Piśmiennictwo rozprawy jest bogate, składa się z 225 pozycji, trafnie wyselekcjonowanych w odniesieniu do własnego materiału. Doktorantka wykorzystała w przewadze najnowsze prace anglojęzyczne, ale co warte podkreślenia, zamieściła także liczne piśmiennictwo polskich autorów.

Reasumując, oceniam rozprawę mgr Wandy Niepiekło-Miniewskiej bardzo wysoko. Jest to cenna pozycja zarówno pod względem poznawczym, stanowiąca znaczący wkład do poznania patomechanizmów rozwoju i przebiegu atopowego zapalenia skóry, schorzenia które coraz częściej występuje na całym świecie, i które w znacznym stopniu obniża jakość życia chorych. Układ rozprawy jest przejrzysty, a ujęcie tematu rzeczowe. Pracę cechuje wyjątkowa staranność, rzetelność, konsekwencja i dokładna realizacja wytyczonych celów. Na podkreślenie zasługuje również interesująca szata graficzna, dobre jakościowo ryciny, tabele i przejrzyste wykresy. Całość rozprawy udowodniła, że Doktorantka posiadała odpowiednie umiejętności i jest w pełni przygotowana do prowadzenia prac badawczych.

Na tej podstawie stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Wandy Niepiekło-Miniewskiej pt. „Badanie związku genów KIR i HLA oraz maszynerii prezentującej antygen z podatnością i przebiegiem atopowego zapalenia skóry” spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Mam więc zaszczyt przedłożyć Radzie Naukowej moją pozytywną ocenę rozprawy wraz z wnioskiem o dopuszczenie Wandy Niepiekło-Miniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wysoka merytoryczna ocena rozprawy, rzetelność analizy, wartość poznawcza w pełni upoważniają mnie do wystąpienia z wnioskiem do Rady Naukowej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Wandy Niepiekło-Miniewskiej.

Dr hab. n. med. Anita Hryncewicz-Gwóźdź

Anita Hryncewicz-Gwóźdź