

OPINIA

o pracy na stopień doktora nauk medycznych mgr Karoliny Miśkiewicz

pt. „Wpływ blokera reagujących krzyżowo determinant węglowodanowych na wyniki oznaczeń alergenowo swoistych IgE dla wybranych ekstraktów i komponentów alergenowych”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk medycznych liczy 65 stron i składa się z następujących rozdziałów:

1. Wstęp,
2. Założenia i cel pracy,
3. Ocena wpływu inhibitora przeciwciał IgE anty-CCD na stężenie asIgE wobec ekstraktów oraz wybranych molekuł alergenowych pyłku brzozy i tymotki łąkowej za pomocą wieloparametrowych testów fazy stałej (kilkualergenowe panele Polycheck®) dla ekstraktów i molekuł alergenowych z podrozdziałami 3.1. Materiał i metody, 3.2. Wyniki,
4. Porównanie wyników stężeń asIgE dla molekuł alergenowych badanych za pomocą wieloparametrowych testów fazy stałej opartych na technologii mikromacierzy bez inhibitora IgE anty CCD (Immunocap ISAC®) oraz inhibitorem IgE anty CCD (ALEX®) z podrozdziałami 4.1. Materiał i metody, 4.2 wyniki,
5. Dyskusja,
6. Wnioski,
7. Bibliografia (43 pozycje),
8. Streszczenie,
9. Abstract,
10. Spis rycin,
11. Spis tabel

Pracę poprzedza wykaz użytych skrótów. Na wykonanie badań Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

Praca Doktorantki dotyczy ważnej problematyki wykrywania uczuleń na alergeny atopowe przy użyciu najnowocześniejszych metod molekularnej diagnostyki chorób alergicznych,

zwłaszcza atopowych, na które od drugiej połowy XX wieku ciągle narasta w wielu krajach. Podejmuje szczególny aspekt minimalizowania popełniania błędów w rozpoznawaniu uczuleń atopowych wynikających z krzyżowego reagowania obecnych w badanych surowicach przeciwciał anti-CCD (CCD – cross-reacting carbohydrate determinants) w klasie IgE z białkami różnych alergenów i ma też duży aspekt praktyczny, ponieważ może przyczynić się do ograniczania wyników fałszywie dodatnich.

W krótkim czterostronicowym wstępie Doktorantka bardzo zwięźle przedstawiła definicje pojęć, jakimi posługuje się w pracy oraz historię odkrycia IgE przed 55-laty i rozwój diagnostyki chorób alergicznych opartej na badaniu stężeń IgE i alergenowo-swoistych IgE (asIgE). Metody oznaczania asIgE ciągle doskonalono, a w 2011 r. wprowadzono pierwszy test oparty na wykorzystaniu mikrotechnologii (ImmunoCAP ISAC[®], firmy Phadia) rozpoczynając erę diagnostyki molekularnej w alergologii. Równolegle trwały badania nad własnościami alergizującymi znanych już, a także nowo wyodrębnianych białek występujących w źródłowych materiałach alergenowych, co doprowadziło do opracowania metod diagnostyki opartej na komponentach alergenowych. Okazało się również, że złożone białka wielu alergenów (glikoproteiny) mogą zawierać niebiałkowe składniki (motywy) węglowodanowe tworzące wspomniane CCD, mające jako glikoproteiny własności immunogenne i stymulujące do produkcji swoistych przeciwciał anti-CCD IgE, które cechuje wysoka zdolność do reakcji krzyżowych z białkami innych alergenów, co może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich skutkujących istotnymi błędami diagnostycznymi (fałszywe rozpoznanie uczulenia). Aby wykluczyć taką możliwość opracowano różne poliwalentne „blokery” wiążące się tylko z anti-CCD IgE, bez zdolności wiązania się z asIgE (np. ProGlicAn CCD-blocker, pochodzący z białka ananasa – bromelainy).

Praca doktorska dotyczy właśnie tych zagadnień, a Doktorantka sformułowała dwa cele, które chciała osiągnąć podejmując badania:

1. Ocena wpływu inhibitora przeciwciał IgE anti-CCD na stężenie asIgE wobec ekstraktów oraz wybranych molekuł alergenowych pyłku brzozy i tymotki łąkowej za pomocą wieloparametrowych testów fazy stałej (kilkualergenowe panele Polycheck[®]) dla ekstraktów i molekuł alergenowych.
2. Porównanie wyników stężeń asIgE dla molekuł alergenowych badanych za pomocą wieloparametrowych testów fazy stałej opartych na technologii mikromacierzy bez inhibitora IgE anti CCD (ImmunoCAP ISAC[®]) oraz inhibitorem IgE anti CCD (ALEX[®]).

Realizacja tak wytyczonych celów wymagała dwóch różnych serii badań, które Doktorantka właściwie zaplanowała i wykonała.

1. Badania dla realizacji pierwszego celu wykonana z użyciem surowic od 155 pacjentów diagnozowanych w pracowni Immunologii Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Oddziału Trenowego Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Rabce-Zdroju, u których potwierdzono obecność zarówno swoistych IgE dla wyciągów alergenowych pyłku brzozy i tymotki łąkowej oraz przeciwciał anti-CCD IgE.

2. Do badań dla realizacji drugiego celu użyto 40 surowic dzieci diagnozowanych w Klinice Alergologii i Pneumonologii Oddziału Trenowego Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Rabce-Zdroju diagnozowanych z powodu chorób alergicznych z obecnością asIgE przeciw alergenom wziewnym i/lub pokarmowym wykrytych przy użyciu testu ImmunoCAP ISAC®. Wpływ inhibitora IgE przeciwko CCD badano przy użyciu testu ALEX®.

Wyniki wykonanych badań przedstawiła w określonym porządku, bardzo przejrzystie w postaci tabelarycznej lub graficznie.

Zwraca uwagę, że w analizie wyników zastosowała właściwe, nowoczesne metody statystyczne: rozbudowaną statystykę opisową, testy rozkładu zmiennych oraz testy korelacji liniowej i regresji w różnych współczesnych modyfikacjach.

Doktorantka wykazała, że dla molekuł pyłku tymotki łąkowej rPhl p 1 (g205) i dla molekuł pyłku brzozy rBet v 1 (t215) i rBet v2 (t216) metoda Polycheck® z użyciem blokera anti-CCD IgE daje wyniki porównywalne z metodą bez blokera anti-CDD IgE, natomiast w przypadku molekuł pyłku tymotki łąkowej rPhl p 5 (g215) oraz ekstraktów pyłków brzozy (t3) i tymotki łąkowej (g6), dodanie blokera anti-CCD IgE wyraźnie obniżało wyniki surowiczych stężeń IgE. Dowodzi to, że różne białka alergenowe pochodzące z tego samego materiału źródłowego różniły się pod względem występowania CCD.

Wykazała również, że obecność dodatku blokera anti-CCD IgE w surowicach badanych metodą ALEX® pozwoliła na wykrycie i eliminowanie uzyskanych w badaniu ImmunoCAP ISAC® aż 50% fałszywie dodatnich wyników dla molekuł Act d 2 (kiwi), Api m 1 (pszczoła) i Jug r 2 (orzech włoski), oraz 36% dla molekuly Cup a 1 (pyłek cyprysa).

Uważam, że uzyskując takie wyniki Doktorantka z powodzeniem zrealizowała założone cele pracy i upoważniają one do wysnucia wniosków, że:

1. Zastosowanie inhibitora IgE wobec CCD w diagnostyce alergologicznej opartej na ocenie surowiczych stężeń asIgE pozwala na uzyskiwanie bardziej wiarygodnych wyników w odniesieniu do ekstraktów roślinnych, zwłaszcza w sytuacji, gdy stężenia asIgE są niskie.

2. W przypadku testów opartych na mikromacierzy potwierdzono deklarowaną wysoką zgodność wyników, jednak zastosowanie inhibitora IgE anty-CCD w teście ALEX[®] pozwalało unikać fałszywie dodatnich wyników wynikających z obecności asIgE wobec natywnych alergenów pochodzenia roślinnego oraz jadów owadów błonkoskrzydłych zawierających CCD

W sześciostronicowej, zwięzłej dyskusji Doktorantka krytycznie odniosła się do uzyskanych wyników i omówiła je w kontekście badań innych autorów, jak również, co jest szczególnie ciekawe, w kontekście obecnego stanu doskonalenia metod diagnostyki alergologicznej opartej na badaniu asIgE w surowicy. Rozwinęła też wątek warunków, jakie należałoby spełnić przy wprowadzenia blokera CCD IgE do rutynowych badań wykonywanych dla lekarzy praktyków (całkowite blokowanie przeciwciał anty-CCD IgE, rozcieńczanie badanych próbek przy dodawaniu blokera), co wydaje się być trudne wobec różnorodnych technik obecnie wykonywanych testów do badania asIgE. Należałoby też podjąć szerokie badania w celu określenia tych alergenów, w przypadku których uzyskujemy wyniki fałszywie dodatnie, czyli zawierających CCD. Problem stosowania blokera anty-CCD wydaje się obecnie bardzo ważny, ponieważ w praktyce stosujemy oznaczenia oparte na wyciągach alergenowych. Oczekiwane zastąpienie w badaniach in vitro takich wyciągów alergenami rekombinowanymi, które nie zawierają CCD, wyeliminowałoby problem uzyskiwania fałszywych wyników zależnych od CDD, ale i tak pozostaną inne zafałszowania wyników zależne od konkurencyjnej blokady przez alergenowo swoiste przeciwciała klasy IgG oraz powszechne obecności reagujących krzyżowo przeciwciał klasy IgE przeciw białkom z rodziny profilin.

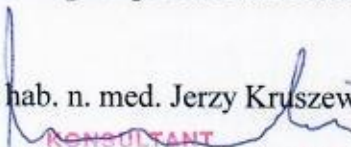
Praca napisana jest ładną polszczyzną, cechuje ją logiczny wywód, właściwe uporządkowanie, konkret i zwięzłe formułowanie myśli. Kilka potknięć (np. używanie różnych terminów na określenie tych samych pojęć (np. bloker – inhibitor, czy anty-CDD IgE) oraz literowych nie ma żadnego znaczenia dla wartości merytorycznej pracy.

Podsumowując uważam, że mgr Karolina Miśkiewicz w swej pracy pt. „Wpływ blokera reagujących krzyżowo determinant węglowodanowych na wyniki oznaczeń alergenowo swoistych IgE dla wybranych ekstraktów i komponentów alergenowych”, na podstawie wyników wykonanych badań i analizy wyników uzyskała oryginalne informacje wnoszące ważny wkład do współczesnej wiedzy z zakresu diagnostyki molekularnej chorób alergicznych. Doktorantka udowodniła bardzo dobrą znajomość poruszanych problemów oraz naukowej analizy uzyskanych wyników. Tekst pracy jest konkretny i bardzo zwięzły, a wnioski wynikają z wyłącznie z otrzymanych wyników. Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca, spełnia przede wszystkim merytoryczne, jak również inne formalne warunki (określone w art. 14 ust. 2 pkt 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie

sztuki [Dz. U. Nr 65, poz. 595] oraz par. 6 ust. 1 rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dn. 19.01.2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, w związku z art. 179 ustawy z dn. 3.07.2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) pracy na stopień doktora nauk medycznych. Ze względu na nowatorstwo i podjęcie ważnego dla praktycznej diagnostyki alergologicznej problemu, zasługuje na wyróżnienie.

Wobec tego mam zaszczyt wystąpić do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Karoliny Miśkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony pracy.

Prof. dr hab. n. med. Jerzy Kruszewski


KONSULTANT
Kliniki Chorób Infekcyjnych i Alergologii
Centralnego Szpitala Klinicznego MON
Wojskowego Instytutu Medycznego

prof. dr hab. n. med. Jerzy KRUSZEWSKI