

Łódź 20.04.2022 r.

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Karoliny Miśkiewicz „Wpływ blokera reagujących krzyżowo determinant węglowodanowych na wyniki oznaczeń alergenowo swoistych IgE dla wybranych ekstraktów i komponentów alergenowych”

Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat obserwowany jest gwałtowny wzrost częstości występowania uczuleń i alergii. Badania epidemiologiczne szacują częstość występowania różnych postaci manifestacji klinicznych alergii na około 30-40% populacji Polski. Ze względu na skalę problemu mówi się o „epidemii” chorób alergicznych. Choroby alergiczne najczęściej rozwijają się u dzieci i młodzieży, a objawy kliniczne utrzymują się przez całe życie chorego co przekłada się na upośledzenie jakości życia pacjenta i jego rodziny, wpływa na wydajność nauki i pracy, oraz stanowi istotne obciążenie systemu opieki zdrowotnej. W wielu przypadkach choroby alergiczne wymagają zintegrowanej opieki specjalistycznej w warunkach ambulatoryjnych, a najcięższe przypadki astmy oskrzelowej czy reakcje anafilaktyczne stanowią istotne zagrożenie życia i wymagają diagnostyki oraz opieki w wysokospecjalistycznych ośrodkach referencyjnych. Bez wątpienia obserwowane trendy epidemiologiczne są wyzwaniem dla wydajności procesów diagnostycznych i systemu opieki zdrowotnej. Doktorantka słusznie zauważa, że rozwój metod diagnostyki molekularnej w ostatnich latach pozwolił na znacznie lepsze wnioskowanie i diagnostykę w alergologii. Do niedawna rozpoznanie przyczyn alergii opierało się na korelacji obrazu klinicznego, punktowych testach skórnych z ekstraktami alergenowymi lub testach natywnych oraz oznaczeniu sIgE z użyciem ekstraktów alergenowych. Jednym z problemów praktycznych diagnostyki molekularnej jest obecność w surowicy badanych pacjentów przeciwciał anti-CCD. Determinanty węglowodanowe (CCD) charakteryzują się wysoką reaktywnością krzyżową. Przeciwciała anti-CCD występują u niektórych tylko pacjentów i wydaje się, że nie mają one wpływu na obraz kliniczny przebiegu alergii. Z drugiej strony w metodach diagnostyki molekularnej obecność przeciwciał anti-CCD może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich, co pociąga za sobą istotne konsekwencje kliniczne błędnego rozpoznania wiodących przyczyn alergii.

Doktorantka w swojej pracy postawiła sobie za cel odpowiedź na jedno z kluczowych pytań nurtujących ekspertów zajmujących się diagnostyką alergologiczną, mianowicie czy diagnostyka molekularna za pomocą testów opartych na technologii mikromacierzy oraz udoskonalenie stosowanych obecnie metod diagnostycznych może zwiększyć ich czułość i/lub swoistość, a co za tym idzie udoskonalic wnioskowanie dotyczące przyczyn pierwotnego uczulenia u pacjentów z chorobami alergicznymi, a w szczególności podjęła próbę oceny wpływu inhibitora przeciwciał IgE anty-CCD na stężenie asIgE wobec ekstraktów oraz wybranych molekuł alergenowych pyłku brzozy i tymotki łąkowej badanych za pomocą wieloparametrowych testów fazy stałej (panele Polychex® dla ekstraktów i molekuł alergenowych) oraz porównała wyniki stężeń asIgE dla określonych molekuł alergenowych badanych za pomocą wieloparametrowych testów fazy stałej opartych na technologii mikromacierzy bez inhibitora IgE anty-CCD (ImmunoCAP ISAC®) oraz z inhibitorem IgE anty-CCD (ALEX®).

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Miśkiewicz pt. „Wpływ blokera reagujących krzyżowo determinant węglowodanowych na wyniki oznaczeń alergenowo swoistych IgE dla wybranych ekstraktów i komponentów alergenowych” składa się z 65 stron maszynopisu i zawiera 18 tabel, 23 ryciny oraz 43 pozycje dobrze dobranej literatury w większości pochodzącej z ostatnich lat. Rozprawa doktorska jest napisana w sposób przejrzysty, poprawnym językiem co ułatwia zapoznanie się z materiałem badawczym, a ryciny i tabele potęgują walor edukacyjny opracowania. Praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ. Składa się z następujących rozdziałów: wstępu, rozdziałów opisujących założenia i cele pracy, materiał, metody badań oraz analizy statystycznej. W kolejnej części rozprawy przedstawiono wyniki analiz, dyskusję, wnioski, bibliografię, streszczenia w języku polskim i angielskim, oraz spis tabel i rycin. Na przeprowadzone badania otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej przy Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

We wstępie doktorantka w syntetyczny i przejrzysty sposób przedstawiła mechanizmy nadwrażliwości typu natychmiastowego, podstawy rozpoznania oraz znaczenie diagnostyki komponentowej we współczesnej alergologii. Szczegółowo opisano znaczenie determinant węglowodanowych (CCD) w klinice oraz potencjalne znaczenie obecności IgE anty-CCD w diagnostyce alergologicznej. Analizując cele pracy, doktorantka podjęła się oceny wpływu zastosowania inhibitora przeciwciał IgE anty-CCD na czułość i swoistość wieloparametrowych testów fazy stałej i powszechnie dostępnych platform ISAC® oraz ALEX®. Uważam, że podjęty temat badawczy doskonale wpisuje się w nurt współczesnych badań w alergologii i odpowiada na istotne problemy kliniczne z którymi borykamy się w codziennej pracy klinicznej.

W pracy przebadano surowicę 155 pacjentów diagnozowanych w Pracowni Immunologii Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Oddziału Terenowego Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Rabce u których stwierdzono obecność swoistych przeciwciał w klasie IgE dla ekstraktów alergenowych pyłków brzozy i tymotki oraz jednocześnie obecność przeciwciał IgE skierowanych przeciwko CCD. Wśród metod badawczych wykorzystano powszechnie stosowany test Polychex® bez blokera anty CCD oraz po wcześniejszym dodaniu do surowicy blokera anty-CCD. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą standardowych metod. Przedstawiono charakterystykę badanej grupy oraz wyniki oznaczeń dla poszczególnych molekuł alergenowych. W drugiej części pracy wykorzystano surowicę 40 dzieci a oznaczenia stężenia alergenowo swoistych przeciwciał IgE wykonano za pomocą wieloparametrowych testów opartych na technologii mikromacierzy: ImmunoCAP® ISAC oraz ALEX®. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą standardowych metod, a w wynikach omówiono charakterystykę badanej grupy dzieci oraz opisano zgodność wyników uzyskanych w obu analizowanych testach wieloparametrowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorantka stwierdziła, że metoda Polychex® z użyciem blokera anty-CCD jest porównywalna z metodą podstawową (bez blokera anty-CCD) w przypadku oznaczeń sIgE dla molekuły tymotki rPh p 1 (g205) oraz molekuł brzozy rBet v 1 (t215) i rBet v 2 (t216). Natomiast dodanie blokera anty-CCD obniża wyniki sIgE dla pozostałych analizowanych molekuł tymotki rPhl p 5 (g215), ekstraktu pyłku brzozy oraz ekstraktu pyłku tymotki. Obecność inhibitora IgE anty-CCD w platformie ALEX® pozwoliła na eliminację fałszywie dodatnich wyników uzyskanych w badaniu ImmunoCAP® ISAC w przypadku 50% dodatnich oznaczeń dla molekuły Act d 2, Api m 1 i Jug r 2 oraz w 36,4% dodatnich oznaczeń dla molekuły Cup a 1.

Biorąc pod uwagę wyniki swoich badań doktorantka wyciągnęła szereg istotnych klinicznie wniosków. Stwierdzono, że zastosowanie inhibitora IgE wobec CCD w diagnostyce przyczyn uczulenia pacjenta pozwala na uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników, co może być szczególnie istotne w przypadku niskiego stężenia sIgE w stosunku do ekstraktów alergenów roślinnych. W przypadku testów wieloparametrowych zastosowanie inhibitora IgE anty-CCD w teście ALEX® pozwala na eliminację fałszywie dodatnich wyników w stosunku do natywnych molekuł alergenowych pochodzenia roślinnego oraz jadu owadów błonkoskrzydłych posiadających w swojej strukturze CCD. W dyskusji doktorantka, szeroko omówiła wyniki swoich badań na tle odpowiednio dobranej literatury fachowej.

Do niewątpliwych zalet pracy należy zwrócenie uwagi na istotny praktycznie temat trudności diagnostycznych w przypadku obecności determinant węglowodanowych (CCD), które mogą być przyczyną fałszywie dodatnich wyników oznaczeń IgE w przypadku niektórych alergenów. Moim zdaniem przedstawiona praca stanowi cenne uzupełnienie naszej wiedzy w zakresie diagnostyki w alergologii. Na podkreślenie zasługuje fakt zbadania kilku powszechnie stosowanych metod: testów panelowych Polycheck® oraz porównanie między sobą dwóch testów wieloparametrowych (ISAC® oraz ALEX®). Umożliwiło to doktorantce spojrzenie na problem badawczy z dwóch różnych perspektyw. Zastosowane metody statystyczne umożliwiły prawidłowe wnioskowanie. Cennym uzupełnieniem badania jest dyskusja, w której doktorantka krytycznie przeanalizowała wyniki własnych badań na tle dostępnego piśmiennictwa.

Jako recenzent zobowiązany jestem do wypunktowania potencjalnych ograniczeń przedstawionej mi do oceny rozprawy. W tym przypadku jest to bardzo trudne. Z punktu widzenia klinicysty i praktyka niezwykle cenne było by moim zdaniem przedstawienie obrazu klinicznego problemów alergologicznych, które były stwierdzane w badanych grupach i próba oceny potencjalnego wpływu błędów w diagnostyce bez zastosowania przeciwciał anty-CCD na wnioskowanie kliniczne i dalsze postępowanie u pacjentów. Takie przedstawienie zagadnienia dodatkowo wzmocniło by przekaz wynikający z prezentowanych przez doktorantkę wniosków („kliniczna istotność uzyskanych wyników”). Interesujące było by również zbadanie omawianych zagadnień w populacji pacjentów uczulonych na alergeny jadów owadów błonkoskrzydłych. Doktorantka w pracy zwraca uwagę na ten rodzaj alergii i znaczenie CCD w diagnostyce. Porównanie testów wieloparametrowych też podkreśla wagę determinant węglowodanowych w zafałszowaniu wyników dla molekuly Api m1, a test Polycheck® (panel jady owadów) jest szeroko stosowany w codziennej praktyce. Czy dodatek markera CCD w tym panelu jest wystarczający do wnioskowania klinicznego? W dyskusji doktorantka zwraca uwagę na fakt, że wprowadzenie blokera CCD do rutynowej diagnostyki mogło by być trudne. Czy w takim razie należy promować diagnostykę opartą wyłącznie na molekułach rekombinowanych? Jakie są potencjalne ograniczenia takiego podejścia do diagnostyki alergologicznej? Czy inne błędy w diagnostyce alergologicznej *in vitro* wynikające np. z konkurencyjnego wiązania się przeciwciał z klasy IgG czy reakcje krzyżowe profilin stanowią częsty problem praktyczny?

Podsumowując uważam, że prezentowane wyniki badań są niezwykle cenne dla naszej wiedzy i praktyki klinicznej. Badania doktorantki doskonale wpisują się w nurt nowoczesnych badań w alergologii i odpowiadają na istotne pytania z punktu widzenia problemów codziennej praktyki. Gorąco zachęcam do opublikowania omawianych analiz w czasopiśmie

o międzynarodowym zasięgu. Przedstawione powyżej nieliczne uwagi krytyczne w żaden sposób nie umniejszają wartości poznawczych recenzowanego opracowania. Jako recenzent pracy stwierdzam, że mgr Karolina Miśkiewicz właściwie określiła cele badawcze, starannie przeprowadziła badania i wyciągnęła odpowiednie wnioski. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dn. 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Karoliny Miśkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę niezwykle ambitny projekt badawczy, wysoką ocenę wartości merytorycznej pracy, wagę kliniczną zakresu badań i poruszanej tematyki zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji pracy.

PROFESOR UCZELNI
Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Maciej Kupczyk
dr hab. n. med. Maciej Kupczyk

dr hab. n. med. Maciej Kupczyk prof. uczelni