



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I KLINIKA DERMATOLOGII

ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. 061 869-12-85, 869-16-12
fax 061 869-15-72
e-mail: dermask2@amp.edu.pl

Prof. dr hab. med. Magdalena Czarnecka-Operacz
Katedra i Klinika Dermatologii oraz
Pracownia Chorób Alergicznych
Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 30.10.2016r

Ocena rozprawy doktorskiej

Lek. Anny Zaleskiej

Ocena parametrów immunologicznych u osób uczulonych na naskórek kota poddanych dolimfatycznej immunoterapii swoistej z użyciem szczepionki MAT-Fel d 1.

Promotorem rozprawy doktorskiej jest Prof. Marek Jutel , jeden z największych autorytetów zarówno w Europie jak i na świecie w zakresie alergenowej immunoterapii swoistej . Same badania przeprowadzono w Instytucie Swiss Allergy and Asthma Research (SIAF) , w Davos, w Szwajcarii (Kierownikiem Instytutu jest Prof. Cezmi Akdis), natomiast roli opiekuna projektu podjął się Dr Mübeccel Akdis. Projekt współfinansowany był przez: Swiss National Science Foundation: grant nr 32-132899, 320030-127618/1, 320030-125249/1, 32NM30-136032/1 , EURONANOMED , The Christine Kühne-Center for Allergy Research and Education, Davos (CK-CARE) oraz MeDALL: European Commission's Seventh Framework Programme - grant nr 261357 .

Tematyka alergenowo swoistej immunoterapii jest mi szczególnie bliska i z wielką przyjemnością zapoznałam się z przedstawionym mi do oceny , bardzo wartościowym materiałem naukowo-badawczym.

Jak wiadomo zainteresowanie immunoterapią swoistą (SIT) jako metodą leczenia chorób alergicznych wyraźnie wzrosło na przestrzeni ostatnich dekad, chociaż pierwsze próby jej stosowania w alergii sięgają początków XX wieku. W 1903 r. Dunbar pochodzący z Hamburga podjął próbę biernej immunizacji chorych na alergiczne zapalenie błony śluzowej nosa, uczulonych na alergeny pyłku traw, poprzez aplikację zwierzęcej antysurowicy dla pyłku traw, na błonę śluzową nosa pacjentów. Kilka lat później Noon zasugerował, że aktywną immunizację przy zastosowaniu szczepionek alergenowych (zawierających alergeny pyłku traw) można z powodzeniem stosować w leczeniu niektórych chorób alergicznych. Nieco później Freeman opublikował wyniki własnych obserwacji świadczące o ustępowaniu objawów klinicznych u chorych na sezonowy alergiczny nieżyt nosa, którzy leczeni byli szczepionkami alergenowymi. Natomiast w 1915 r. Cooke już formalnie wprowadził immunoterapię swoistą do medycyny amerykańskiej, publikując wyniki leczenia prowadzonego w grupie 114 pacjentów z sezonowym alergicznym nieżytem nosa i astmą atopową .

SIT, określona wcześniej jako desensytyzacja (odczulanie) została na przestrzeni kolejnego półwiecza wysoce zmodyfikowana i stała się powszechnie zaakceptowaną metodą leczenia chorób alergicznych. Pomimo, że metoda ta stosowana jest w terapii alergologicznej od ponad 100 lat, nie wszyscy akceptują takie właśnie podejście terapeutyczne. Wynika to być może z faktu, że dokładny mechanizm jej działania, który jest przecież podłożem dla obserwowanej skuteczności klinicznej tej metody pozostaje nie w pełni wyjaśniony.

Kolejnym elementem budzącym wiele dyskusji i polemik są niektóre wskazania do zastosowania szczepionek alergenowych. Przykładem może być atopowe zapalenie skóry, w przypadku którego skuteczność tej metody została już dobrze udokumentowana, jednak nadal nie włączono tej jednostki chorobowej do wskazań do jej wdrożenia .

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska lek. med. Anny Zaleskiej liczy 108 stron i zawiera 168 pozycji literaturowych, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, 20 rycin oraz 8 tabel, których spis przedstawiono w końcowej części rozprawy doktorskiej . Praca została zredagowana i podzielona na rozdziały według klasycznego schematu stosowanego w rozprawach doktorskich.

Na wstępie przedstawiony został wykaz zastosowanych w rozprawie skrótów, co zdecydowanie ułatwia lekturę .

We wprowadzeniu zawierającym część pogładową w kolejnych podrozdziałach Doktorantka szczegółowo omówiła aktualną wiedzę w zakresie alergicznego nieżytu nosa z punktu widzenia etiopatogenetycznego, epidemiologicznego oraz klinicznego. Następnie szczegółowo scharakteryzowała główny alergen kota-Fel d1 , czynniki ograniczające rozpowszechnienie immunoterapii swoistej w leczenie chorób alergicznych, nową drogę substytucji alergenowej, czyli immunoterapię limfatyczną (LIT) , molekułę MAT i MAT-alergen, SIT i rozwój obwodowej tolerancji immunologicznej w trakcie jej prowadzenia, wpływ SIT na komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną, a następnie przedstawiła aktualną wiedzę dotyczącą histaminy, receptorów histaminowych oraz ich potencjalnej roli w rozwoju zarówno objawów chorób alergicznych , jak również indukcji obwodowej tolerancji .

Całość rozdziału „Wprowadzenie” stanowi zatem znakomite, w pełni wyczerpujące wprowadzenie czytelnika do badań własnych Doktorantki. Warto podkreślić, iż zawarte w tej części rozprawy informacje dotyczą wyjątkowo szerokiej sfery wiedzy odnoszącej się do immunologii doświadczalnej oraz klinicznej, a sam rozdział napisany został we wzorowy i niezwykle interesujący sposób, wzbogacony o ryciny odzwierciedlające zawartą w rozdziale treść.

Założenia i cel pracy Doktorantka zawarła w trzech jasnych i precyzyjnych punktach. Były nimi :

1. Ocena skuteczności i bezpieczeństwa SIT z zastosowaniem szybkich schematów odczulania typu przyspieszonego.
2. Zbadanie wpływu przyspieszonych schematów odczulania na ekspresję receptorów histaminowych HR1, HR2, HR4 na limfocytach krwi obwodowej.
3. Ocena wpływu zmian w ekspresji poszczególnych typów limfocytarnych receptorów histaminowych HR1, HR2, HR4 na skuteczność SIT.

W rozdziale „ Metody” Doktorantka omówiła dokładnie charakterystykę poddanych badaniu pacjentów oraz zastosowane szerokie metodologicznie badania w wyselekcjonowanej populacji pacjentów. A mianowicie :

- Izolację PBMC z krwi obwodowej i zakładanie hodowli komórkowej
- Ocenę tempa proliferacji limfocytów
- Ilościową ocenę cytokin w nadsączach mikrohodowli aktywowanych jednojądrowych komórek krwi obwodowej (PBMC)
- Pomiar stężenia Fel d 1-swoistych p/ciał IgE i IgG4 w osoczu krwi
- Izolację mRNA i odwrotną transkrypcję
- Poziom ekspresji genów przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR3.2.7.
- Genotypowanie antygenów HLA-DR
- Ocenę populacji alergenowo swoistych limfocytów T CD4+ z wykorzystaniem tetramerów MHC klasy II i cytometrii przepływownej

Już sam zakres przeprowadzonych badań i wysoki poziom zastosowanej metodologii bardzo pozytywnie świadczy o ocenianym projekcie badawczym i ogromnym doświadczeniu Doktorantki w zakresie badań w sferze immunologii doświadczalnej.

Następnie uzyskane wyniki badań poddano ocenie statystycznej, której zasady zostały opisane w sposób szczegółowy oraz co ważne przedstawiona została zgoda Komisji Etycznej na przeprowadzenie projektu naukowo-badawczego.

Rozdział ten napisany został w sposób wzorowy i nie buzi żadnych zastrzeżeń.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka szczegółowo przedstawiła wszystkie dane wynikające z przeprowadzonych badań, a mianowicie ,

- Proliferacja limfocytów T w odpowiedzi na MAT-Fel d 1 ILIT
- Odpowiedź cytokinowa na leczenie szczepionką dolimfatyczną MAT-Fel d 1
- Produkcja Fel d 1 swoistych p/ciał klasy IgE i IgG4 w odpowiedzi na MAT-Fel d 1 ILIT
- Produkcja Fel d 1-swoistych p/ciał klasy IgG4 w korelacji z produkcją IL-10
- Ekspresja receptorów histaminowych i czynników transkrypcyjnych na alergenowo-swoistych limfocytach T
- Wpływ MAT-Fel d 1 ILIT na ekspresję receptorów H1R, H2R, H4R

- Wpływ MAT-Fel d 1 ILIT na ekspresję czynników transkrypcyjnych limfocytów T
- Zmiany w populacji limfocytów T CD4+ pod wpływem MAT-Fel d 1 ILIT
- Wpływ MAT-Fel d 1 ILIT na populację Fel d 1-swoistych (tetramer+) limfocytów T CD4+
- Wpływ MAT-Fel d 1 ILIT na populację limfocytów T FOXP3+CD4+
- Wpływ MAT-Fel d 1 ILIT na populację limfocytów T CD4+CRTh2+ i CD4+CCR7+

Rozdział ten wywiera wrażenie wręcz imponujące skrupulatnością badawczą Doktorantki oraz umiejętnością zaprezentowania w graficzny sposób uzyskanych wyników badań.

Rozdział „Wnioski” napisany został w sposób przejrzysty, i zawiera 5 jasno sprecyzowanych wniosków o bardzo wysokiej istotności merytorycznej, które Doktorantka sformowała na podstawie uzyskanych wyników :

1. Szczepienie MAT-Fel d 1 ILIT wykazywało działanie immunogenne i indukowało zarówno humoralną jak i komórkową odpowiedź immunologiczną.
2. Bezpośrednia aplikacja szczepienia do węzłów chłonnych i poprawa prezentacji antygeny w układzie MHC klasy II ograniczyły straty dawki i pozwoliły po 2 miesięcznym okresie leczenia i tylko 3 iniekcjach na rozwój zmian immunologicznych odpowiedzialnych za tolerancję.
3. Zmiany immunologiczne w odpowiedzi na szczepienie były trwałe i postępujące w czasie.
4. Krótki czas trwania leczenia (2 miesiące) i tylko 3 iniekcje skutkowały 100% frekwencją pacjentów kończących terapię.
5. MAT-Fel d 1 ILIT może stanowić alternatywę dla długiej i kosztownej, klasycznej immunoterapii podskórnej.

Rozdział ten, podobnie zresztą jak poprzednie świadczy o wysokiego stopnia dojrzałości naukowo-badawczej Doktorantki i moim zdaniem stanowi wzorowy sposób zaprezentowania obserwacji poczynionych w projekcie badawczym.

Za szczególne zalety ocenianej pracy doktorskiej uznaję :

1. Wybranie ciekawego i niezwykle istotnego tematu pracy doktorskiej mającego duże znaczenie zarówno naukowo-badawcze jak i praktyczne .
2. Autorka wykazała się bardzo dużą rzetelnością i pracowitością już na etapie planowania badania.
3. Uzyskanie ciekawych i bardzo wartościowych wyników stanowiących uzupełnienie wiedzy w zakresie mechanizmów leżących u podłoża immunoterapii swoistej.
6. Praca ta stanowi początek dalszych badań nad możliwością zastosowania alternatywnej drogi podania szczepionki alergenowej dla długiej i kosztownej, klasycznej immunoterapii podskórnej.

W zakresie drobnych usterek rozmaitej natury , w tym edytorskiej praktycznie nie mam żadnych uwag.

Moja ocena rozprawy doktorskiej lek.med. Anny Zaleskiej jest bardzo wysoka. Sposób przeprowadzenia zaplanowanych przez Doktorantkę badań, rzeczowa dyskusja i przedstawione wnioski świadczą o niezwyklej dojrzałości naukowej i badawczej Autorki oraz możliwości dalszego, samodzielnego już prowadzenia kolejnych badań naukowych. Obecnie stoimy na progu rozwoju nowego etapu badań immunologicznych w zakresie alergenowej immunoterapii swoistej i przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest dowodem na aktywny udział polskich naukowców w tym niezwykle fascynującym obszarze immunologii doświadczalnej. Co jest dodatkowo niezwykle istotne to możliwość zastosowania nowych odkryć badawczych pozwoli na poprawę klinicznych metod terapeutycznych w odniesieniu do chorób alergicznych , w przypadku których immunoterapia swoista pozostaje nadal jedyną możliwością terapii przyczynowej.

W związku z powyższym mam zaszczyt przedłożyć Pani Dziekan i Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o przyjęcie rozprawy lek. med. Anny Zaleskiej za odpowiadającą wymogom stawianym pracom doktorskim, spełnia warunki określone w art.13 ust.1

ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki(Dz.U.Nr65,poz 595, z póź.zm.) i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Dodatkowo ze względu na wyjątkową wartość merytoryczną pod względem nowatorskim, metodologicznym oraz naukowo-poznawczym, zwracam się do Pani Dziekan oraz Wysokiej Rady z prośbą o jej szczególne wyróżnienie.**



Prof.dr hab.med.Magdalena Czarnecka-Operacz