

Uch 25.10.16  
M. Podhorska-Okolow  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Wydział Lekarski  
Prodziekan ds. Nauki

Dr hab. n med. Jolanta Zalejska-Fiolek prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolow

Zabrze, 2016.10.20

Katedra i Zakład Biochemii

Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym  
w Zabrze

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO	
wpt. dn.	25 PAŹ. 2016
Ldz. DL	4629/2016
Znak sprawy DL-	

#### OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Emilii Królewicz pt.:

#### OCENA PRZYDATNOŚCI DIAGNOSTYCZNEJ TESTU AKTYWACJI BAZOFILA (BAT) W ALERGII NA PLEŚŃ *ALTERNARIA ALTERNATA*.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi cenny element w badaniach nad opracowaniem czułego i swoistego testu diagnostycznego w alergii na pleśnie. Analizując dane literaturowe należy zauważyć, iż odkrycie trzeciorzędowej struktury większości alergenów, a także otrzymanie ich w formie alergenów rekombinowanych spowodowało znaczny wzrost ilości badań poświęconych możliwościom praktycznego ich wykorzystania. Prowadzone badania zwracają uwagę świata nauki na niedoskonałości stosowanych obecnie rutynowo testów diagnostycznych oraz powody odmiennej odpowiedzi chorych na podstawowe leczenie stosowane w alergii, czyli immunoterapię swoistą. Nowoczesne narzędzia diagnostyczne przyczynić się więc mogą do wprowadzenia skuteczniejszej immunoterapii opartej na ocenie pełnego profilu nadwrażliwości pacjenta. Terapia taka będzie z pewnością bezpieczniejsza i da lepsze rezultaty z powodu możliwości tworzenia hipoalergicznym wariantów alergenów rekombinowanych.

Dysertacja doktorska przedłożona mi do recenzji obejmuje 107 stron tekstu podzielonego prawidłowo na rozdziały: wstęp, cele i założenia pracy, materiały i metody, wyniki badań, dyskusję wyników, wnioski, streszczenie oraz bibliografię. Autorka zamieściła także na początku pracy wykaz skrótów używanych w tekście rozprawy, a na końcu spis rycin i tabel oraz aneks zawierający tabele przedstawiające odpowiednio, liczby zidentyfikowanych bazofilów oraz aktywność spoczynkową bazofilów wraz z aktywnością bazofilów „brutto” dla poszczególnych prób wśród osób z grupy kontrolnej i badanej.

Rozprawa została napisana starannie oraz poprawnie pod względem formalnym, językowym, stylistycznym i interpunkcyjnym.

Z uwagi na założone cele pracy, układ wstępu jest właściwy. We wstępie liczącym 28 stron Autorka, powołując się prawidłowo na dane z piśmiennictwa, przybliżyła podstawowe zagadnienia dotyczące alergii, w tym na grzyby pleśniowe, z dokładniejszym opisem jednego z głównych alergenów

- Alt a 1. Przedstawiła krótką charakterystykę bazofili i mastocytów. Przybliżyła metodę cytometrii przepływowej i testu BAT. Opisała markery identyfikacji i aktywacji bazofilów oraz aneksynę V jako potencjalny marker aktywacji bazofila w diagnostyce alergii na pleśń *Alternaria alternata*. Pomimo, iż praca dotyka niewątpliwie aktualnego problemu naukowo-medycznego, jedynie 27% pozycji, na które Autorka powołuje się w całej pracy, obejmuje pozycje piśmiennictwa z ostatnich 5 lat.

W kolejnym rozdziale dysertacji, Autorka przedstawiła cele swoich badań. Autorka założyła:

1. Zbadanie możliwości zastąpienia testów skórnych typu *prick*, badaniami cytometrycznymi w połączeniu z oznaczeniami sIgE w diagnostyce alergii na pleśń *Alternaria alternata*.
2. Ocenę przydatności i skuteczności diagnostycznej aneksyny V jako markera aktywacji bazofila w diagnostyce alergii na pleśń *Alternaria alternata*.
3. Określenie stopnia wiązania aneksyny V do błony bazofila, po stymulacji bodźcami nieswoistymi i swoistymi, jako wyznacznika stopnia aktywacji bazofila, szczególnie sprawdzenie, czy zdolność wiązania aneksyny V zależy od stężenia zastosowanego wyciągu alergenowego pleśni *Alternaria alternata*.

Poprawnie i jasno sformułowane założenia badawcze świadczą o dojrzałości naukowej Autorki.

Badania zaplanowano w sposób właściwy.

Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu Nr KB – 517/2013 z dnia 07.11.2013. Każdorazowo, po zapoznaniu pacjenta z procedurami składającymi się na projekt badawczy i podpisaniu przez niego świadomej zgody na udział w badaniach, przeprowadzano wywiad z uczestnikiem projektu i założono kartę badania.

Badania przeprowadzone zostały na grupie 65 osób (39 kobiet i 26 mężczyzn) w wieku od 17 do 54 lat (Me=24 lata). Grupę badaną stanowiły 32 osoby uczulone na alergeny pleśni z klinicznymi objawami alergii i dodatnimi wynikami testów skórnych z wyciągiem alergenów *Alternaria alternata* (w tym 15 kobiet i 17 mężczyzn; Me=25 lat, kobiety stanowiły 47% osób uczulonych na alergeny pleśni *Alternaria alternata*, a mężczyźni 53%). Kryterium włączenia stanowiły: wiek 17-55 lat oraz objawy sezonowego lub całorocznego alergicznego nieżytku nosa, a u niektórych pacjentów także objawy astmy alergicznej, związanej z uczuleniem na alergeny pleśni *Alternaria alternata*. Autorka podaje, że badania prowadzono u chorych w porze roku i warunkach klimatycznych zapewniających niskie stężenie zarodników i strzępek *Alternaria*, co pozwalało na całkowite odstawienie leków przeciwhistaminowych na okres 14 dni przed terminem badania. Wiadomo, że alergja wziewna u osób nadwrażliwych na alergeny grzybów może mieć charakter zarówno sezonowy, jak i całoroczny. Najczęściej obserwuje się występowanie objawów przez cały rok, z wyraźnym nasileniem w okresie letnim i jesiennym, kiedy to znacząco wzrasta stężenie zarodników grzybów mikroskopowych w atmosferze. Związane jest to oczywiście z cyklem występowania zarodników grzybów w powietrzu. Dla grzybni gatunku *Alternaria*

*alternata* optymalna temperatura wzrostu wynosi od 22 do 28°C. Przy spadku temperatury poniżej 0°C zarodniki pojawiają się w znikomej liczbie. Liczba zarodników grzybów zewnętrzdomowych może spaść do zera jedynie po obfitych opadach śniegu zimą. Przyjmuje się, że szczyt sezonu zarodnikowania przypada na lipiec i sierpień, kiedy to stężenia sięgać mogą poziomu kilkuset zarodników w 1 m<sup>3</sup> powietrza. Należałoby podać więc w jakich konkretnie miesiącach i przy jakiej temperaturze panującej na zewnątrz prowadzono badania?

Grupę kontrolną stanowiły 33 osoby z ujemnymi wynikami testów skórnych na panel alergenów wziewnych i bez objawów klinicznych alergii, w tym 24 kobiety i 9 mężczyzn; Me=23 lata, kobiety stanowiły 73% osób z grupy kontrolnej, a mężczyźni 27%. Czy te badania prowadzono w takich samych warunkach klimatycznych i o tej samej porze roku?

Podczas eksperymentu wykonywano kolejno:

1. Testy skórne typu *prick* na panel alergenów wziewnych z użyciem ekstraktów zakupionych w firmie Allergopharma® Joachim Ganzer KG, Reinbek, Republika Federalna Niemiec. Na podstawie wyników testu oraz wywiadu dokonano kwalifikacji do odpowiedniej grupy.
2. Oznaczono IgE alergenowo swoiste przeciwko alergenowi *Alternaria alternata* z wykorzystaniem odczynników oraz zautomatyzowanej aparatury UniCAP 100 firmy Phadia, Uppsala, Szwecja.
3. Test aktywacji bazofila w postaci wiązania aneksyny V do powierzchni błony bazofila za pomocą cytometru przepływowego FACScan firmy Becton Dickinson, San Diego, USA.
4. Analizę uzyskanych danych z wykorzystaniem oprogramowania CellQuest firmy Becton Dickinson, San Diego, USA.
5. Poprawną analizę statystyczną.

Każdy etap wykonanej pracy został przez Autorkę wyczerpująco i dokładnie opisany. Wszystkie zastosowane procedury i metody badawcze są w pełni dopracowane i poprawne analitycznie.

Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione w sposób przejrzysty, omówione i poddane prawidłowej analizie statystycznej. Stanowiły także solidną podwalinę do przeprowadzonej dyskusji.

Wyniki obejmowały:

1. Dokładną charakterystykę grupy badanej i kontrolnej pod względem płci oraz wieku osób w poszczególnych grupach. Ta część pracy, w moim odczuciu, wymaga uściślenia. Nie rozumiem bowiem tak dokładnej analizy pod względem wieku i płci osób badanych, szczególnie, że nie założono analizy uwzględniającej te cechy oraz nie ustosunkowano się do przedstawionych tu wyników w dyskusji lub/i wnioskach. Czy znane są Autorce prace wskazujące na różnice pod względem podatności na alergeny a wiekiem lub/i płcią?

2. Wyniki przeprowadzonych testów skórnych, z których wynika brak różnic statystycznie istotnych w teście skórnym z histaminą pomiędzy badanymi grupami, natomiast istotne różnice pomiędzy grupami kontrolną i badaną w teście skórnym z wyciągiem alergenowym *Alternaria alternata*. W grupie badanej był on statystycznie istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej.
3. Wyniki oznaczeń stężeń IgE alergenowo swoistego przeciwko alergenowi *Alternaria alternata* m6, z których wynika, że stężenie sIgE anti-m6 w grupie badanej było statystycznie istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Autorka w tym rozdziale w tabelach 8 i 9 przedstawiła stężenia sIgE anti-m6 odpowiednio dla grupy kontrolnej i badanej, co moim zdaniem było zbędne. Tabele te można było zamieścić w aneksie. W zupełności wystarczają tu dane przedstawione w tabeli 10, prezentującej wartości liczbowe i procentowe sIgE dla grupy badanej z podziałem na klasy. Istotny jest natomiast komentarz, iż w 32-osobowej grupie badanej uzyskano 27 wyników dodatnich i 5 wyników ujemnych swoistego IgE skierowanego przeciwko alergenowi pleśni *Alternaria alternata* m6.
4. Wyniki oznaczeń cytometrycznych obejmujące liczbę komórek zidentyfikowanych jako bazofile, aktywność bazofilów w próbie niestymulowanej oraz w próbach stymulowanych, aktywność bazofilów w badanej próbie, aktywację bazofilów bodźcami nieswoistymi i swoistymi, czułość i swoistość stymulacji bazofila oraz zależność odsetka aktywnych bazofilów od stężenia bodźca swoistego.

Uzyskane wyniki stanowiły dobrą podwalinę do przeprowadzonej dyskusji. W dyskusji Doktorantka wykazała przede wszystkim istotną potrzebę opracowania skuteczniejszego testu diagnostycznego w kierunku diagnozowania przeciwko alergenom. Doktorantka przedstawiła w dyskusji dokładną analizę i interpretację uzyskanych wyników. Jedynie, niepotrzebnie moim zdaniem, jeszcze raz prezentowała wyniki uzyskanych badań.

Na początku dyskusji Autorka wykazała niską przydatność testów skórnych typu *prick* stosowanych w przypadku alergii wziewnej, szczególnie dla dzieci, kobiet w ciąży oraz osób starszych. Powodami są m.in. zmiana reaktywność skóry wraz z wiekiem, schorzenia dermatologiczne, dermografizm, przeciwwskazania do odsunięcia leków przeciwhistaminowych oraz stosowanych w schorzeniach kardiologicznych i psychiatrycznych.

Autorka wykazała także, z uwagi na stale wzrastający problem alergizacji społeczeństw, konieczność prowadzenia badań zmierzających do ujednoczenia składu biochemicznego ekstraktów alergenowych oraz unifikacji jednostek charakteryzujących ich siłę biologiczną. Bowiem z uwagi na w/w rozbieżności istnieje uzasadniony problem dotyczący porównywania

wyników badań prowadzonych w różnych ośrodkach naukowych zarówno w obrębie kraju, jak i całego świata.

Ustosunkowała się także do uzyskanych wyników z zakresu oznaczenia stężenia i klasy swoistego IgE skierowanego przeciwko wyciągowi alergenów *Alternaria alternata* m6. Słusznie, gdyż aż 5 osób spośród 32 uczulonych na ten gatunek pleśni, uzyskało wynik sIgE anty-m6 poniżej 0,35 kU/l, a więc poniżej dolnej granicy stężenia, od którego wynik uznawany jest za pozytywny i kwalifikowany do 1 klasy sIgE. Biorąc pod uwagę, że obecnie w celu zwiększenia czułości i swoistości testów rozważa się przesunięcie dolnej granicy stężenia sIgE z 0,35 kU/l na 0,1 kU/l, Autorka posługując się zabiegiem matematycznym, wyznaczyła rzeczywisty punktu odcięcia, rozumiany jako wartość stężenia sIgE anty-m6, powyżej której wynik testu uznawany jest za pozytywny. Przyjęcie za właściwy punkt odcięcia stężenia sIgE anty-m6 równego 0,22 kU/l pozwoliło Autorce na uzyskanie wysokiej czułości metody, sięgającej nieco powyżej 90% i swoistości równej 100%. W grupie badanej znalazło się dwoje pacjentów, których stężenie przeciwciał wobec *Alternaria* wynosiło 0,22 kU/l oraz 0,31 kU/l. Było to w pełni uzasadnione, ponieważ, jak zauważa Autorka, gdyby przyjąć za wartość progową stężenie 0,35 kU/l, obie osoby zostałyby wyeliminowane z grupy badanej, co zmniejszyłoby wartość diagnostyczną testu.

Autorka wskazała także na wysoką przydatność diagnostyczną testów komórkowych z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej, jako na nowoczesną metodę badawczą stwarzającą możliwość udoskonalenia współczesnej diagnostyki alergologicznej. W tym miejscu przeanalizowała drobiazgowo uzyskane wyniki badań w odniesieniu do wyników badań innych ośrodków badawczych. Uwypukliła także i przedyskutowała rolę aneksyny V. Wykazała jednoznacznie zalety badania cytometrycznego z użyciem aneksyny V. Z uwagi na koszt badania, jak również porównywalną skuteczność procedur laboratoryjnych w stosunku do efektywności eksperymentów z zastosowaniem popularnych handlowo przeciwciał, wydaje się, że dalsze prowadzenie badań and użyciem aneksyny V jest zasadne. Równocześnie Autorka wskazała na konieczność przeprowadzenia dalszych badań wykorzystujących testy aktywacji bazofila z różnymi markerami i alergenami pleśni, w celu walidacji metody. Sugeruje to krytycyzm w stosunku do uzyskanych wyników, a więc potwierdza dojrzałość naukową Autorki.

Tą część dyskusji uważam za w pełni dojrzałą i przydatną do sformułowania końcowych wniosków.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz szczegółowej analizy uzyskanych wyników Doktorantka przedstawiła uzasadnione wnioski, które stanowią odpowiedź na założenia pracy. Autorka stwierdziła, że:

1. Wykonanie testu BAT z aneksyną V oraz oznaczenie swoistego IgE skierowanego przeciwko *Alternaria alternata* zwiększa diagnostyczne możliwości laboratoryjne w zakresie uczulenia na pleśń. Łączna przydatność obu metod może z powodzeniem zastąpić testy skórne typu *prick*, uznawane za „złoty standard” we współczesnej diagnostyce alergologicznej.
2. Ocena stopnia wiązania aneksyny V do powierzchni błony bazofila po stymulacji bodźcem nieswoistym i swoistym charakteryzuje się 100% czułością w przypadku aktywacji wyciągiem alergenowym *Alternaria alternata* w stężeniu najwyższym 100 SBU/ml i 93,8% czułością w stężeniu pośrednim 10 SBU/ml. Nieco niższą czułość równą 90,6% uzyskano w eksperymentach z najniższym stężeniem ekstraktu pleśni 1 SBU/ml oraz w wyniku stymulacji anty-IgE. Swoistość testu wynosi 100% niezależnie od stężenia roztworu alergenów pleśni, a w przypadku anty-IgE kształtuje się na niskim poziomie sięgającym 30%.
3. Czułość oznaczenia alergenowo swoistych IgE cechuje się taką samą, 100% swoistością oraz niższą czułością niż badanie cytometryczne z najwyższym i pośrednim stężeniem wyciągu *Alternaria*.
4. Stopień wiązania aneksyny V do powierzchni błony bazofila po stymulacji wyciągiem alergenowym, rozumiany jako jego aktywacja, zależy od stężenia ekstraktu *Alternaria alternata*. Najwyższa średnia i mediana aktywacji bazofilów „netto” została uzyskana podczas stymulacji roztworem alergenowym *Alternaria alternata* o najniższym stężeniu C3=1 SBU/ml.
5. Aneksyna V może zostać uznana za nowy i skuteczny marker aktywacji bazofila, o dużym znaczeniu diagnostycznym w wykrywaniu alergii na *Alternaria alternata*.

Uzyskane wyniki badań posiadają charakter nowatorski, poznawczy, jak i duży potencjał aplikacyjny. Reasumując, pracę mgr inż. Emilii Królewicz pt.: Ocena przydatności diagnostycznej testu aktywacji bazofila (BAT) w alergii na pleśń *Alternaria alternata*, oceniam bardzo pozytywnie. Praca stanowi wartościowe, prawidłowo zaplanowane i zrealizowane opracowanie naukowe. Uważam, że praca ta otwiera drogę do wprowadzenia do badań diagnostycznych nowatorskich testów analitycznych o wysokiej czułości i swoistości, co pozwoli na wyeliminowanie wyników fałszywie dodatnich, które mogą wystąpić u osoby zdrowej wykazującej jedynie wrażliwość na dany składnik wziewno-pokarmowy. Uzyskane wyniki stanowią także dobrą podstawę do dalszych badań pozwalających na skuteczną i szybką diagnostykę alergii w przyszłości.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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, z późn. zm.).

Z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o **dopuszczenie** mgr inż. Emilii Królewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**ADIUNKT**

Katedry i Zakładu Biochemii  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

*Jolanta Zalejska-Fiolka*  
dr hab. n. med. Jolanta Zalejska-Fiolka

Jolanta Zalejska-Fiolka