



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfelda

Polska Akademia Nauk

Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>

13 października 2016

***Dziekanat Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
ul. Mikulicza-Radeckiego 5
50-345 Wrocław.***

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Emilii KRÓLEWICZ pt. „**Ocena przydatności diagnostycznej testu aktywacji bazofila (BAT) w alergii na pleśń *Alternaria alternata***”.

Rozprawa doktorska Pani mgr Emilii Królewicz została napisana w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Ireny Kustrzeby Wójcickiej.

Dotychczasowy dorobek naukowy mgr Emilii Królewicz, która dopiero rozpoczyna karierę naukową jest znaczący. Pani Królewicz jest współautorem 9 publikacji naukowych i 11 komunikatów zjazdowych.

Doktorantka podjęła się próby wykonania, zoptymalizowania i oceny przydatności diagnostycznej testu aktywacji bazofila (BAT) w alergii na pleśń *Alternaria alternata*. Dodatkowym celem pracy było sprawdzenie, czy aneksyna V może zostać uznana za nowy marker aktywacji granulocyta zasadochłonnego i zastąpić antygeny powszechnie stosowane w testach komórkowych, takie jak CD63 lub CD203c.

Od strony edytorskiej praca jest w większości dobrze napisana. Przegląd literatury we wstępie pracy jest logiczny i uporządkowany. Omawiane zagadnienia są przedstawione w postaci rozdziałów i podrozdziałów. Przedstawiona do oceny praca zawiera na 107 stronach wszystkie wymagane rozdziały. Zamieszczono łącznie 40 rycin i 21 tabel. Przedstawione zagadnienia poparte są bogato cytowaną literaturą (142 pozycje).

We wstępie Doktorantka w sposób szczegółowy zapoznaje czytelnika z pojęciem alergii, definiuje typy reakcji nadwrażliwości, opisuje symptomy alergii na pleśń *Alternaria alternata* oraz definiuje poznane alergeny tego grzyba. W ostatniej części wstępu Doktorantka zajmuje się testami diagnostycznymi i metodami służącymi do identyfikacji alergii. Charakteryzuje zakres badań zamieszczonych w dysertacji. Wstęp pracy jest obszerny i świadczy o znakomitym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do podjęcia pracy eksperymentalnej nad określeniem przydatności diagnostycznej testu aktywacji bazofilów w alergii.

Cele i założenia pracy są jasno zdefiniowane. Testy skórne (prick), które są uważane za „złoty standard” we współczesnej diagnostyce chorób alergicznych, są zawodne, szczególnie u osób przyjmujących leki przeciw alergiczne. Z tego względu istnieje potrzeba poszukiwania i stosowania innych testów, dzięki którym możliwe będzie ulepszenie skuteczności diagnostyki chorób alergicznych. Celem pracy Doktorantki była ocena przydatności cytometrii przepływownej oraz oznaczenie sIgE w diagnostyce alergii na pleśń *Alternaria alternata*. Dodatkowo Doktorantka podjęła się próby oceny przydatności aneksyny V jako markera aktywacji bazofilów w diagnostyce alergii.

Badania zostały przeprowadzone na dwóch grupach wolontariuszy, jedną stanowili ludzie zdiagnozowani z alergią na pleśń *Alternaria alternata*. Grupę kontrolną stanowiły osoby z ujemnymi wynikami testów skórnych na panel alergenów wziewnych i bez objawów klinicznych alergii. Opis użytych metod i testów zawiera niezbędne informacje dla zrozumienia, w jaki sposób badania zostały przeprowadzone.

Praca doktorska mgr Emilii Królewicz została zaprojektowana i wykonana solidnie. Doktorantka scharakteryzowała bardzo dokładnie populację wolontariuszy zakwalifikowanych do badań z uwzględnieniem płci i wieku w grupie kontrolnej i badanej. Następnie u wszystkich badanych osób przeprowadziła dwa testy skórne, jeden z histaminą i drugi z wyciągiem alergenowym *Alternaria alternata*. Otrzymane wyniki przedstawiła w klarownej formie graficznej. Kolejnym etapem badań były pomiary stężenia przeciwciał klasy IgE swoistych przeciwko alergenowi z *Alternaria alternata* u każdej osoby z dwóch badanych grup. Ważną wartością diagnostyczną u osób z alergią stanowi ilość i aktywność bazofili. W tym celu Doktorantka użyła cytometrii przepływowej, która pozwoliła jej nie tylko zidentyfikować populację bazofili, ale również określić spoczynkową aktywność bazofili oraz aktywność bazofili stymulowanych bodźcem niespecyficznym (przeciwciałem anty-IgE) jak i specyficznym (alergen z *Alternaria alternata*). Otrzymane wyniki wskazują, że procent aktywnych bazofilów jest istotnie wyższy w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej.

W końcowej części badań eksperymentalnych Doktorantka zbadała czułość i specyficzność reakcji bazofilów na bodźce swoiste. Czułość oznacza zdolność testu do wykrywania osób rzeczywiście uczulonych. Swoistość jest parametrem pozwalającym na wyeliminowanie wyników fałszywie dodatnich, które mogą wystąpić u osoby zdrowej. Z przeprowadzonych badań wynika, że największa czułość i specyficzność reakcji bazofilów na swoiste bodźce otrzymano przy stymulacji próbką alergenu z *Alternaria alternata* o stężeniu końcowym 100 SBU/ml.

Doktrantka wnikliwie i kompetentnie odnosi się do własnych wyników i dyskutuje je na tle cytowanej, obszernej literatury przedmiotu (142 pozycje literaturowe). Jednym z celów prowadzonych przez autorkę badań było wykazanie, że wiązanie aneksyny V zależy od aktywacji bazofila wyciągiem alergenowym i może mieć zastosowanie w diagnostyce chorób alergicznych.

Warto zwrócić uwagę, że współczesna diagnostyka uczuleń na grzyby mikroskopowe opiera się na testach skórnych typu prick i oznaczaniu przeciwciał klasy IgE. Testy te nie

zawsze są wiarygodne, zaleca się więc wykorzystanie cytometrii przepływowej do pomiaru stopnia aktywacji bazofili (BAT) stymulowanych swoistym bodźcem. Połączenie obu technik znacznie zwiększa trafność rozpoznania alergii na pleśnie.

Oczywiście, droga do zaprojektowania nowego testu diagnostycznego alergii na pleśnie, z wykorzystaniem aneksyny V do identyfikacji stopnia aktywacji bazofili stymulowanych alergenem, jest daleka. Doktorantka zdaje sobie z tego sprawę pisząc w końcowej części dyskusji, że otrzymane w niniejszej pracy wyniki, zachęcają do prowadzenia dalszych prac w celu walidacji tej metody diagnostycznej.

Wnioski sformułowane pod koniec dysertacji są poprawne. Zastosowanie aneksyny V zwiększa możliwości diagnostyczne w zakresie uczulenia na pleśnie. A zatem białko to może zostać uznane za nowy i skuteczny marker aktywacji bazofila, o dużym znaczeniu diagnostycznym w wykrywaniu alergii na *Alternaria alternata*.

W końcowej części mojej recenzji chciałbym Doktorantce zadać kilka pytań i skupić się nad pracą od strony edytorskiej.

Przedstawiona charakterystyka osób (wiek, płeć, wyniki testów skórnych) w grupie kontrolnej i badanej intuicyjnie wygląda poprawnie. Chciałbym jednak zapytać czy Doktorantka używała jakiegoś testu, aby wykazać, że prawdopodobieństwo wystąpienia błędu systematycznego jest poniżej 5%?

Na rysunku 8 przedstawia Doktorantka wyniki testu skórniego z wyciągiem alergenowym *Alternaria alternata* w grupie kontrolnej i badanej. W grupie kontrolnej wyniki testu u wszystkich badanych osób mają wartość zero. Jaki Doktorantka zastosowała test statystyczny do obliczenia tego prawdopodobieństwa? Intuicyjnie obliczanie wartości p , gdzie wszystkie osoby z grupy kontrolnej mają wartość zero, nie ma sensu.

Pomimo solidnej pracy pod względem merytorycznym Doktorantka nie ustrzegła się przed niedociągnięciami edytorskimi. Na stronie 26 Doktorantka napisała: "Do tej pory poznano biologiczną rolę tego białka [aneksyna V] w procesie apoptozy, jako zaprogramowanej śmierci komórki, jednak liczba doniesień literaturowych na ten temat jest niewystarczająca". Trudno mi się zgodzić z tym stwierdzeniem. Pobieżny Internetowy przegląd literatury naukowej na temat roli aneksyny V w wykrywaniu wczesnej apoptozy wyświetla ponad 10 000 prac naukowych na ten temat. Być może Doktorantka miała co innego na myśli. Chciałbym to wiedzieć.

Na stronie 34 i kolejnych stronach, w podrozdziale „Metody” Doktorantka podaje informację z jaką prędkością odwirowywała krew – 3000 obrotów/min przez 15 min. Raczej powinno to być przeliczone na RCF (relative centrifugal force), które jest niezależne od typu i wielkości wirówki.

Na stronie 36 jest napisane: „Po zakończonej inkubacji, do każdej próbki dodawano 2 ml płynu lizującego komórki Lysing Solution, BD Biosciences, San Diego, USA i

pozostawiano na 10 minut w temperaturze pokojowej.” Stwierdzenie to jest mylące. Tutaj nie chodzi o liczbę wszystkich komórek, ale tylko o erytrocyty.

Na rycinach 4-6, 16-25, pokazane są wykresy punktowe przedstawiające rozkład bazofili. Niestety w opisie do rycin jest za mało informacji. Osie „x” i „y” są opisane jako FL-2H i FL-1H, a oznakowanie osi powinno zawierać informację o odczynnikach fluorescencyjnych, którymi zostały wyznakowane bazofile, w tym wypadku bazofile zostały wyznakowane przeciwciałem anti-CCR3 połączonym z fikoerytryną (FL-2H) oraz aneksyną V połączoną z FITC (FL-1H) i tak należy opisać osie x, y. Wykresy punktowe nie zawierają też bezwzględnej liczby bazofili, tylko rozkład procentowy. Bezwzględna liczba jest ważna, bo istotność procentowego rozkładu bazofili przy małej ilości komórek jest inna niż przy dużej ilości komórek.

Generalnie zarówno ryciny i tabelki powinny zawierać informację konieczną do zrozumienia wyniku bez uciekania się do informacji zamieszczonej w innej części pracy.

W kilku miejscach dysertacji te same wyniki są przedstawione w dwóch różnych formach, które nie wnoszą żadnej dodatkowej informacji i mogłyby być przedstawione w jednej z dwóch form. Na przykład w tabeli 3 i rycinie 7 jest przedstawiony procentowy udział kobiet i mężczyzn w dwóch grupach, kontrolnej i badanej. Przy okazji warto zauważyć, że w grupie badanej jest dwukrotnie więcej mężczyzn niż w grupie kontrolnej. Czy zastosowała Doktorantka jakiś test, aby potwierdzić, że ta nierównowaga nie jest statystycznie istotna?

Ryciny 37 i 38 są mało czytelne i warto byłoby się zastanowić nad inną formą prezentacji tych wyników. A przy okazji chciałbym Doktorantkę zapytać czym wytłumaczy obserwację, że odsetek aktywnych bazofilów między badanymi osobami nie wykazuje żadnej korelacji z wartością stężenia ekstraktu alergenowego? U jednych osób aktywacja bazofili jest większa przy największym stężeniu alergenu u innych najmniejsza, wreszcie u kilku badanych osób największa aktywność bazofili jest przy stymulacji pośrednim stężeniem alergenu.

Wyniki na rycinach 39 i 40, w których porównuje się procent aktywowanych bazofili po stymulacji alergenem w grupie kontrolnej i badanej mogłyby z powodzeniem być przedstawione na jednej rycinie. Pozwoliłoby to na lepsze uwypuklenie różnic między grupą kontrolną a badaną.

Praca jest dobrze zredagowana, ale mogłaby być bardziej zwarta, co przyczyniłoby się do większej przejrzystości. Na przykład opisy zastosowanych technik i metod badawczych mogłyby być krótsze z uwzględnieniem tylko najważniejszych informacji.

Powyższe uwagi w żadnej mierze nie podważają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej mgr Emilii Królewicz, a wymieniam je z racji sumienności recenzenta, aby przy ewentualnej publikacji pracy doktorskiej wzięła je pod uwagę.

Reasumując stwierdzam, że przyszło mi recenzować ciekawą pracę doktorską. Chciałbym zwrócić uwagę na pracowitość i czas Doktorantki spędzony przy badaniu 65 wolontariuszy testami *in vivo* jak i *in vitro*! Wysiłek i pracowitość jest wielkim atutem w pracy naukowej.

Rozprawa doktorska mgr inż Emilii Królewicz pt.: "**Ocena przydatności diagnostycznej testu aktywacji bazofila (BAT) w alergii na pleśń *Alternaria alternata***" spełnia warunki określone w art.13 ust. 1 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, z późn. zm.). Przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie magister inżynier Emilii Królewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Myc, Ph.D.



Associate Professor
Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy
Department of Immunology of Infectious Diseases
Polish Academy of Sciences
Wroclaw, Poland
and
Faculty of Biological Sciences
University of Zielona Góra
Zielona Góra, Poland

Associate Research Scientist Emeritus
Department of Internal Medicine
Michigan Nanotechnology Institute for Medicine and Biological Sciences
Email: myca@umich.edu