**Streszczenie**

Alergeny grzybów mikroskopowych są ważną przyczyną chorób dróg oddechowych oraz schorzeń skóry u osób uczulonych. Współczesna diagnostyka nadwrażliwości
na pleśnie opiera się na wykonywaniu testów skórnych typu *prick* oraz oznaczaniu swoistych IgE w teście fluoroimmunoenzymatycznym. Wyniki badań uzyskiwane
za pomocą obu metod często nie są spójne i nie można ich bezpośrednio porównywać.
Z tego powodu należy posługiwać się dodatkowymi narzędziami laboratoryjnymi, dzięki którym możliwe będzie postawienie trafnego rozpoznania alergii. Obiecująca techniką
w tej dziedzinie jest cytometria przepływowa.

W niniejszej dysertacji doktorskiej podjęto próbę wykonania, zoptymalizowania
i oceny przydatności diagnostycznej testu aktywacji bazofila (BAT) w alergii na pleśń *Alternaria alternata*. Celem pracy było również 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.

Badania wykonano w grupie 65 osób, z których 32 pacjentów było uczulonych
na *Alternaria alternata* i prezentowało objawy kliniczne, a pozostałych 33 uczestników badań nie wykazywało objawów schorzeń o podłożu alergicznym.

W przeprowadzonym teście komórkowym ocenie podlegał stopień wiązania aneksyny V do powierzchni błony komórkowej bazofila, po stymulacji anty-IgE oraz wyciągiem alergenowym *Alternaria alternata*. W celu wykazania aktywacji bazofila wykorzystano zjawisko reorganizacji błony granulocyta zasadochłonnego pod wpływem zastosowanych bodźców. W procesie tym fosfatydyloseryna, jako główny fosfolipid składowy ulega przemieszczeniu z cytozolowej na zewnętrzną stronę błony bazofila.
Przy użyciu aneksyny V związanej z fluorochromem i stanowiącej ligand
dla fosfatydyloseryny, udowodniono powstawanie barwnego kompleksu, możliwego
do zobrazowania w cytometrze przepływowym. Fluorescencję wykazywały tylko
te komórki, do których związała się aneksyna V, czyli zaktywowane bazofile.

Wyniki badań cytometrycznych charakteryzowały się 100% czułością i swoistością
w przypadku ekstraktu alergenowego *Alternaria* o najwyższym przyjętym stężeniu.
Po zastosowaniu 10-cio i 100-krotnie rozcieńczonego roztworu stymulującego obserwowano nieco niższą czułość metody w granicach 94-91%, jednak swoistość pozostawała nadal na poziomie 100%.

Rezultaty przeprowadzonych eksperymentów są zadowalające z uwagi na fakt,
że uzyskano wyższą czułość testu BAT, niż oznaczenia sIgE jako powszechnie stosowanej metody referencyjnej. Ma to szczególne znaczenie w przypadku prawidłowej diagnozy u osób z objawami alergii, które miały pozytywne wyniki testów skórnych
w kierunku pleśni, a zarazem podprogowe miano przeciwciał wobec antygenów *Alternaria.*

Udowodniono, że łączna przydatność badania cytometrycznego i pomiar immunoglobulin klasy E może z całą pewnością stanowić alternatywę dla testów skórnych typu *prick*, stosowanych rutynowo w diagnostyce alergologicznej. Pomimo wysokich kosztów wykonania badania, testy BAT posiadają wiele zalet, które zdecydowanie przekonują do wykorzystywania ich w praktyce klinicznej w celu poprawy skuteczności współczesnej diagnostyki schorzeń alergologicznych. Wśród najważniejszych wymienić należy minimalizację ryzyka związanego z wystąpieniem reakcji niepożądanych
dla zdrowia pacjenta oraz brak wymagań co do odstawienie leków przeciwhistaminowych przez chorego na okres 14 dni przed wykonaniem testu. Ponadto możliwość różnicowania reakcji krzyżowych i rzeczywistego poliwalentnego uczulenia oraz uzyskiwanie obiektywnych wyników w krótkim czasie, zachęcają do intensywnego rozwijania badań
z wykorzystaniem testów BAT.

**Summary**

Allergens of microscopic fungi are an important cause of respiratory and skin diseases in sensitized persons. Modern diagnosis of hypersensitivity to molds is based on skin performing prick tests and determining specific IgE using fluoroimmunoenzymatic test. Test results obtained by both methods are often not consistent and may not be directly compared. For this reason, additional laboratory tools should be used, whereby accurate allergy diagnosis will be possible. Flow cytometry is a promising technique in this field.

In this doctoral dissertation is an attempt at performing, optimizing and evaluating
the diagnostic usefulness of the basophil activation test (BAT) in an allergy to *Alternaria alternata*. The aim of this thesis was also to investigate if annexin V may be considered
as a new basophil activation marker and if it may replace the antigens commonly used
in cell tests, such as CD63 or CD203c.

The studies were performed in a group of 65 people, of whom 32 patients were sensitized to *Alternaria* and presented clinical symptoms, and the remaining 33 did not present symptoms of allergy-based diseases.

In the conducted cell test the degree of annexin V binding to the surface of basophils cell membrane after stimulation with anti-IgE and *Alternaria* allergenic extract was assessed. In order to demonstrate the basophil activation the phenomenon of basophil membrane reorganization under the influence of the applied stimuli was used.
In this process, phosphatidylserine as the main constitutive phospolipid is displaced from
the cytosolic to the basophils external membrane site. Using annexin V bound
to a fluorochrome, which is the ligand for phosphatidylserine, it was proven that a colored complex forms which it is possible to depict in a flow cytometer. The only fluorescent cells were those bounded to annexin V, i.e. activated basophils.

The results of cytometric studies were characterized by 100% sensitivity
and specificity in the case of the highest concentration of *Alternaria* allergen extract.
After applying the 10- and 100-fold dilution of the stimulation solution a slightly lower sensitivity in the range 94-91% was observed, but specificity still remained at 100%.

The results of the conducted experiments are satisfactory due to the fact
that the obtained sensitivity of BAT was higher than the sensitivity of specific IgE determination which is the commonly used reference method. This is particularly important for the accurate diagnosis in patients with allergic symptoms who had positive skin test results in the direction of mold and simultaneously a subliminal antibody titre against antigens of *Alternaria.*

It has been proven that the overall usefulness of the flow cytometry study and the measurement of immunoglobulin E class may certainly be an alternative to skin prick tests, routinely used in allergy diagnosis. Despite the high costs of research, BAT tests have many advantages, which strongly argue for their use in clinical practice in order
to improve the efficiency of contemporary alergological diagnosis. Among the most important ones, the minimization of the risk of reactions adverse to the patient's health and the lack of requirement that antihistamines be discontinued 14 days prior to BAT test
are worth mentioning. In addition, the possibility to differentiate cross-reactions from
an actual polyvalent allergy and to obtain objective results in a short time, pose a strong encouragement to an intensive development of research using BAT tests.