

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Marty Rosiek-Biegus
z Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Marity Nittner-Marszalskiej

VDA:
M. Malon

„Przydatność diagnostyki molekularnej w ocenie klinicznej, kwalifikacji i monitorowaniu immunoterapii pacjentów z IgE-zależną nadwrażliwością na jad os i pszczoł”

Alergia na jad owadów błonkoskrzydłych (HVA) jest jedną z najczęstszych przyczyn anafilaksji, zwłaszcza w grupie osób dorosłych. Objawy po użądleniu mogą obejmować zarówno reakcje miejscowe jak i uogólnione. Przyczynowe postępowanie terapeutyczne polega na unikaniu ekspozycji oraz prowadzeniu immunoterapii swoistej, przed którą konieczne jest wykazanie IgE-zależnego mechanizmu reakcji. Badania diagnostyczne obejmują testy skórne oraz oznaczenie sIgE przeciwko ekstraktom jadów. W większości przypadków badania te są wystarczające do potwierdzenia alergii, jednak u niewielkiej grupy chorych pomimo przeprowadzonej diagnostyki nie udaje się jednoznacznie potwierdzić owada sprawcy z powodu niewykazania przeciwciał przeciwko ekstraktowi jadu osy i pszczoły lub też obecności przeciwciał przeciwko obu jadom. Diagnostyka komponentowa stanowi w takich przypadkach cenne uzupełnienie tradycyjnych metod diagnostycznych wykorzystujących ekstrakt jadu. Wykorzystuje się ją zwłaszcza w przypadku osób uczulonych na oba jady. Istotne jest zatem prowadzenie badań, które pozwolą na pełniejszą ocenę przydatności diagnostyki molekularnej w ocenie klinicznej, kwalifikacji i monitorowaniu immunoterapii pacjentów z IgE-zależną nadwrażliwością na jad owadów błonkoskrzydłych. Biorąc pod uwagę powyższe, uważam, że zarówno wybór tematu jak i podjęcie badań przez lek. Martę Rosiek-Biegus, jest ważne i uzasadnione.

Przedstawiona mi do recenzji praca obejmuje 120 stron maszynopisu, 24 rysunki i 24 tabele. Piśmiennictwo obejmuje 171 pozycji literatury polskiej jak i zagranicznej, zdecydowana większość pochodzi z ostatniego dziesięciolecia. Praca ma typowy układ dla tego typu rozpraw i obejmuje wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki,

omówienie wyników, dyskusję i wnioski. Do pracy dołączone są także streszczenia w języku polskim i angielskim.

W części teoretycznej pracy Doktorantka przedstawiła w sposób szczegółowy informacje dotyczące epidemiologii alergii na jady owadów, obrazu klinicznego tej nadwrażliwości, charakterystyki jadów owadów błonkoskrzydłych, diagnostyki oraz prowadzenia immunoterapii swoistej ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania diagnostyki komponentowej.

Po przeanalizowaniu wiadomości zawartych w części teoretycznej pracy, Autorka sformułowała założenia oraz cel pracy. Główny cel badania stanowiło określenie przydatności diagnostyki komponentowej w kwalifikacji i monitorowaniu immunoterapii jadem owadów błonkoskrzydłych. Dodatkowo Doktorantka założyła 5 celów szczegółowych: 1. ocena profilów uczuleń na jad osy i pszczoły u pacjentów z systemowymi reakcjami alergicznymi na jad owadów; 2. ocena korelacji pomiędzy wynikami testów z ekstraktem jadu a wynikami testów z komponentami molekularnymi jadu owadów; 3. ocena zależności między ciężkością reakcji poużądleniowej u pacjentów uczulonych na jad osy i pszczoły a profilem uczulenia na poszczególne molekuly jadów; 4. analiza związku pomiędzy uczuleniem na molekuly jadu osy i pszczoły a bezpieczeństwem immunoterapii oraz 5. analiza związku pomiędzy uczuleniem na molekuly jadu osy i pszczoły a skutecznością immunoterapii.

Grupę badaną stanowiło 167 pacjentów z HVA zakwalifikowanych do immunoterapii jadem owadów w Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii. Grupę referencyjną stanowiło 816 pacjentów z HVA poddanych immunoterapii alergenowej w latach 2012-2018. Kwalifikacja do VIT w obu grupach odbywała się przy zastosowaniu tego samego protokołu.

Pacjentów z grupy badanej podzielono na 3 podgrupy: A - z alergią na jad osy i zakwalifikowanych do VIT jadem osy, B - z alergią na jad pszczoły i zakwalifikowanych do VIT jadem pszczoły oraz C - z alergią na oba jady i zakwalifikowanych do VIT dwoma jadami. U pacjentów zakwalifikowanych do immunoterapii jadem wykonywano testy skórne, sIgE przeciwko ekstraktowi jadu, a także dodatkowo u osób uczulonych na jad osy oznaczano sIgE przeciwko molekułom głównym jadu osy Ves v 1 i Ves v 5. W grupie chorych uczulonych na jad pszczoły oznaczono dodatkowo sIgE przeciwko molekułom jadu pszczoły Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5 i Api m 10. W obu grupach oznaczano stężenie tryptazy w surowicy. U części pacjentów odczulanych jadem pszczoły oznaczono również sIgE

przeciwko molekułom jadu po co najmniej 6 miesiącach trwania VIT. W ocenie stężenia sIgE w surowicy przeciwko ekstraktom jadu stosowano metodę ELISA, przeciwko molekułom jadu osy i pszczoły oraz stężenie tryptazy w surowicy metodę ImmunoCAP System.

Immunoterapię jadem w fazie wstępnej prowadzono metodą „ultra-rush” zgodnie z protokołem Muellera osiągając w okresie 3.5 godziny dawkę sumaryczną 111.1 µg jadu. W fazie wstępnej stosowano preparat jady osy i pszczoły Pharmedal (Alk Abello). Leczenie w fazie podtrzymującej prowadzono zgodnie z protokołem EAACI i producenta szczepionki Alutard (Alk Abello).

Zgromadzone informacje wpisano do bazy danych, a następnie poddano analizie statystycznej z zastosowaniem oprogramowania STATISTICA12. Do analizy zmiennych zastosowano testy: Shapiro-Wilk’a, t-studenta, U Mann-Whitney’a oraz Chi kwadrat. Do wykazania zależności pomiędzy zmiennymi ciągłymi wykorzystano współczynniki korelacji Pearsona i Spearmana.

Doktorantka uzyskała wyniki badań, które zostały w dalszej części pracy przedstawione w sposób niezwykle szczegółowy. Grupa pacjentów z alergią na jad osy (A) nie różniła się pod względem cech demograficznych, profilu ciężkości HVA oraz stężenia sIgE od grupy referencyjnej. Wśród pacjentów grupy A większość pacjentów prezentowała po uzdaleniu IgE-zależną reakcję alergiczną zagrażającą życiu (bez zajęcia układu krążenia tj. reakcję III stopnia 45.05% i reakcję z zajęciem układu krążenia tj. IV stopnia 48.35%). U 89.1% pacjentów tej grupy, obok uczulenia na ekstrakt jadu osy za pomocą testu IDT i/lub sIgE wykazano uczulenie na co najmniej jedną z molekuł jadu osy: Ves v 1 i/lub Ves v 5, a u 10.99% na żadną z nich (punkt odcięcia wyniku dodatniego 0.35 kU/l). Zastosowanie progu detekcji 0.1 kU/l obniżyło odsetek ujemnych wyników sIgE na co najmniej jedną z molekuł do 2.19% badanych. Co więcej u pacjentów z niskimi (0.1-0.35 kU/l) stężeniami sIgE przeciwko molekułom jadu osy stwierdzano niższe stężenia cIgE ($p = 0.0007$). Analiza zgodności wyników dodatnich oznaczeń sIgE w surowicy wobec ekstraktu i wobec co najmniej jednej molekuly, Ves v1 lub Ves v 5, wykazała, że u 9.89% badanych w surowicy nie występują przeciwciała sIgE przeciwko ekstraktowi jadu, ale występują przeciwko Ves v 1 i/lub Ves v 5. U 6.69% pacjentów grupy A, wykazano obecność sIgE tylko przy pomocy testów skórnych podczas gdy w surowicy nie występowały sIgE ani przeciwko ekstraktowi jadu ani przeciwko badanym molekułom (wyniki dla punktu odcięcia wyniku dodatniego 0.35 kU/l). W grupie chorych na jad osy wykazano, że niższe stężenia sIgE-Ves v 5 mogą wiązać

się z cięższym przebiegiem reakcji alergicznej ($p = 0.048$) charakteryzującym się objawami ze strony układu krążenia (SYS IV°). Dodatkowo w tej grupie pacjentów wykazano znamienne wyższe stężenia tryptazy w surowicy (SYS I°+II°+III° vs SYS IV°; $p = 0.02$). Nie wykazano natomiast zależności między profilem uczuleń na alergeny główne jadu osy a przebiegiem VIT.

Grupa pacjentów z alergią na jad pszczoły (grupa B) nie różniła się pod względem cech demograficznych, profilu ciężkości HVA oraz stężenia sIgE od grupy referencyjnej. W tej grupie większość pacjentów prezentowała po użądleniu IgE-zależną reakcję alergiczną zagrażającą życiu (bez zajęcia układu krążenia tj. reakcję III° 43.75%, a reakcję z zajęciem układu krążenia 46.88%). W grupie pacjentów z alergią IgE-zależną na jad pszczoły, u 82.61% stwierdzono uczulenie na co najmniej jedną molekułę z badanego panelu tj. Api m 1, 2, 3, 5, lub 10. Najczęściej stwierdzano obecność przeciwciał przeciwko Api m 1 (60.94%) i Api m 10 (58.7%). W tej grupie chorych u 17.39% pacjentów uczulonych na ekstrakt jadu pszczoły nie wykazano uczulenia na żadną z oznaczanych molekuł (punkt odcięcia 0.35 kU/l), obniżenie punktu odcięcia dodatniego testu do 0.1kU/l obniżyło odsetek do pacjentów z ujemnym wynikiem sIgE przeciwko co najmniej jednej z badanych molekuł do 10.87%. Analiza zgodności wyników dodatnich oznaczeń sIgE w surowicy wobec ekstraktu i wobec co najmniej jednej molekuły, wykazała u 8,7% badanych uczulenie na ekstrakt jadu, podczas gdy nie wykazano uczulenia na żadną z oznaczanych molekuł. U 4.35% badanych wykazano obecność uczulenia przeciwko co najmniej jednej z badanych molekuł, ale nie wykazano uczulenia na ekstrakt jadu. Ponadto wykazano wyższe stężenia sIgE-Api m 5 u pacjentów z cięższym przebiegiem reakcji systemowej po użądleniu ($p = 0.03$) oraz z częstszymi powikłaniami podczas fazy wstępnej immunoterapii prowadzonej wg schematu UR ($p < 0.05$). Częstsze powikłania w tej fazie immunoterapii odnotowano również u chorych z wyższym stężeniem sIgE-Api m 1 ($p = 0.009$). Po 6 miesiącach immunoterapii stwierdzano trend do niższych wartości sIgE-Api m 1 ($p = 0.06$). Pacjenci z alergią na jad pszczoły i powikłaniami podczas VIT-UR mieli wyższe stężenie tryptazy 8.51 ± 5.62 vs 5.55 ± 3.42 ($p = 0.019$) niż pacjenci z niepowikłanym VIT-UR.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły Doktorantce na sformułowanie następujących wniosków:

1. Diagnostyka molekularna alergii na jad owadów stanowi cenne uzupełnienie, ale nie zastępuje klasycznych metod diagnostycznych opartych o testy skórne z ekstraktem, testy serologiczne z ekstraktem i ocenę cIgE.

2. W diagnostyce alergii na jad owadów zasadne jest obniżenie progu odcięcia wyniku dodatniego do 0.1 kU/l szczególnie przydatne w grupie pacjentów z alergią na jad owadów i niskimi stężeniami cIgE w surowicy.
3. Oznaczenie stężenie sIgE-Api m 5 może być czynnikiem prognostycznym reakcji systemowej z zajęciem układu krążenia.
4. Oznaczenie stężenia sIgE-Api m 1 i sIgE- Api m 5 mogą być pomocne przy prognozowaniu występowania powikłań podczas VIT-UR.
5. Złożoność profili uczuleń molekularnych na jad pszczoły może mieć związek z gorszą skutecznością immunoterapii jadem pszczoły niż jadem osy.
6. Podwyższone stężenie tryptazy w surowicy zwiększa ryzyko powikłań podczas VIT-UR jadem pszczoły.

Z obowiązku recenzenta zmuszona jestem wymienić pojedyncze drobne błędy/zastrzeżenia, które proponuję skorygować przed publikacją wyników badań:

1. Wkradły się pojedyncze błędy literowe, np.: zakwalifikowaych na str. 88 (4 wers od góry) -> powinno być zakwalifikowanych; Pharnalgen na str. 88 -> powinno być Pharmalgen; itd.
2. W analizie pracy pomocne byłyby spisy tabel i rysunków, chociaż forma numeracji pomaga określić z którego rozdziału pochodzą. Natomiast niektóre rysunki, zdecydowanie swoją formą przypominają tabele: 4.3; 4.13; 4.14; 4.22; 4.23?
3. W załączonym piśmiennictwie jedna z prac została zacytowana niekompletnie – pozycja 52 – podano jedynie rok publikacji.
4. Nie wszystkie skróty zawarte w pracy zostały umieszczone w spisie na początku opracowania i nie wszystkie zostały przetłumaczone w pracy: MCAD – str. 10; białko MRJP – STR. 15; CCD – pojawiło się po raz pierwszy na stronie 18, tłumaczenie w treści na stronie 23, GKS – str. 21; CD – str. 24; CMD – str. 25; BAT – str. 26; ACE i MAO – str. 28; ENDA – str. 39; SD – str. 42;
5. W wykazie skrótów budzą wątpliwości niektóre tłumaczenia, np. sBT, przetłumaczono tryptaza bazalna?; CRD, przetłumaczono diagnostyka komponentowa, może dokładniej byłoby składniki decydujące o diagnozie?

6. Nietypowo zaznaczono w streszczeniu podrozdziały nawiązujące do wszystkich rozdziałów zawartych w pracy (wstęp, cel pracy, metoda i materiał, wyniki, wnioski), zwyczajowo streszczenie jest krótkim podsumowaniem opracowania.
7. W streszczeniu nie znalazłam omówienia grupy C?

Jednakże, powyższe uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko. W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa i wyniki przedstawionych badań stanowią wartościowe i interesujące opracowanie. Rozprawa została dobrze przygotowana i starannie wykonana. Przedstawienie wyników w postaci przejrzystych tabel i rysunków ułatwia prezentację wyników, a czytającemu rozprawę, pomaga w ich analizowaniu. Zestawienie najnowszych pozycji piśmiennictwa, do których odnosi się Autorka, znakomicie zwiększają jej wartość. Dodatkowym atutem pracy jest niezwykle staranna szata graficzna.

Uważam, że rozprawa lek. Marty Rosiek-Biegus „Przydatność diagnostyki molekularnej w ocenie klinicznej, kwalifikacji i monitorowaniu immunoterapii pacjentów z IgE-zależną nadwrażliwością na jad os i pszczoł”, absolutnie **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.)**. Praca stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na szeroką wiedzę teoretyczną Doktorantki. Wnoszę zatem do Rady Dyscyplin Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Marty Rosiek-Biegus do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Wnoszę również o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej.** Doktorantka przygotowała niezwykle rzetelnie, w sposób przejrzysty, bardzo ciekawe wyniki swoich badań, co zapewne będzie bardzo przydatne w dalszych opracowaniach dotyczących poszukiwania złotego standardu rozpoznawania jak i oceny przebiegu immunoterapii swoistej u pacjentów z IgE-zależną nadwrażliwością na jad os i pszczoł.

dr hab. n med. Marta Chelmińska
prof. nadzw. GUMed
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista alergolog
nr ident. ZUS 5629263

Marta Chelmińska
10/02/2021