Dr hab Marita Nittner-Marszalska prof. nadzw.

Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii
Uniwersytet Medyczny im Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul Pasteura 4
Wrocław

Wrocław 06.12.2016r.

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
lek. med. Karola Kempińskiego

pt. „ Analiza skuteczności i bezpieczeństwa leczenia oraz prospektywne badanie ekspresji wybranych genów za pomocą techniki RT-PCR u chorych z alergią na jad owadów błonkoskrzydłych"

Zarówno alergia na jad owadów (HVA), jak immunoterapia jadem owadów (VIT) są uniwersalnym i intrygującym obiektem badań naukowych. Ich wyniki można modelowo ekstrapolować na inne alergie i ogólne mechanizmy immunotolerancji.

Obok aspektu naukowego, istotny w badaniach nad HVA jest aspekt praktyczny. HVA jest zagadnieniem interdyscyplinarnym, budzącym zainteresowanie zarówno alergologów, jak lekarzy każdej specjalności, którzy mają kontakt z przypadkami anafilaksji, której HVA jest najczęstszą przyczyną. Od czasu, gdy wykryto związek między HVA, a zespołami pierwotnej aktywacji mastocytów, pokrzywką barwnikową i mastocytozą systemową, grono specjalistów zainteresowanych HVA poszerzyło się o dermatologów i hematologów. Natomiast wyniki najnowszych badań genetyki HVA i zmian ekspresji genów w przebiegu immunoterapii jadem (VIT), nota bene Autorów z Gdańskiego UM, zwróciły na nią uwagę genetyków. Dlatego przedmiot rozprawy może budzić zainteresowanie i inspirować szerokie grono specjalistów.

Wybór przedmiotu i tematu pracy doktorskiej przez lek. med. Karola Kempińskiego jest właściwy i uzasadniony niedostatkiem lub kontrowersyjnością wyników dotychczasowych badań. Co więcej, obiecuje, że uzyskane wyniki mogą mieć zarówno wymiar teoretyczny (wgląd w mechanizmy immunoterapii), jak i praktyczny (ocena skuteczności i bezpieczeństwa leczenia HVA).

Struktura pracy jest typowa i poprawna. Przedstawiona rozprawa doktorska zawiera wszystkie konieczne rozdziały, takie jak *Wykaz stosowanych skrótów, Wstęp, Cele pracy, Metody, Materiał, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo i Streszczenia.*

Komentarze do treści pracy przedstawię chronologicznie począwszy od wstępu, który jest bardzo interesujący, syntetyczny i stanowi *resume* aktualnych danych na temat HVA i VIT. Autor dowodzi w nim rzetelnej znajomości tematu, umiejętności interpretacji danych, jak i co pożyteczne, znajomości praktyki immunoterapii jadem: przedstawia we właściwym porządku i proporcjach aspekty entomologiczne, symptomatologię, prewencję i leczenie alergii na jad owadów. Mam kilka drobnych zastrzeżeń i uwag odnośnie nieścisłości napotkanych w tej części pracy.

W komentarzu do wyników polskich badań epidemiologii HVA, Autor komentując rozbieżności ich wyników powołuje się na regionalne różnice w ekspozycji na użądlenia przez owady. W rzeczywistości główna przyczyna różnic wskaźników epidemiologicznych leży w metodologii przytaczanych badań, z których jedno analizuje częstość HVA na podstawie odpowiedzi pacjenta na kilka bardzo ogólnych pytań wśród wielu innych oceniających częstość występowania wielu chorób alergicznych, podczas gdy w drugim ta ocena wynika z analizy odpowiedzi na blisko 20 szczegółowych pytań dedykowanych wyłącznie HVA. Metodologia badań epidemiologicznych, a w wypadku badań ankietowych szczegółowość ankiety i sposób jej wypełniania, ma istotne znaczenie dla rezultatu badania.

Nieprawidłowa jest pisownia alergenu klasyfikowanego jako Api m 4 - melityny jadu. Niezależnie od faktu, że w różnych źródłach znajdujemy odmienną pisownię nazwy tego peptydu, za prawidłową jest uznawana „melityna", a nie „mellityna".

Dyskusyjna wydaje mi się opinia Autora wyrażona we wstępie pracy (str. 15) o możliwości przeprowadzania diagnostyki HVA „nie wcześniej niż 2 tygodnie" od użądlenia. Rzeczywiście tak mówią niektóre „starsze" źródła, jednak wyniki pracy Sturma opublikowanej w 2014 roku dowodzą, że wbrew dotychczasowym opiniom po użądleniu nie dochodzi do „konsumpcji" specyficznych przeciwciał IgE. Ich stężenie obniża się w 3 godzinie od użądlenia (w próbie prowokacji żywym owadem w modelu G. Sturma) od -0.08 do -0.13 kU/L, a w okresie kolejnych 7 dni wzrasta do wartości wyższej niż wyjściowa. Uwaga powyższa nie miałaby znaczenia, gdyby nie pilne przypadki kwalifikacji do VIT pacjentów w okresie sezonu lotów owadów, gdy odraczanie diagnostyki naraża pacjenta na odroczenie rozpoczęcia immunoterapii.

Pozostając przy problemach diagnostyki HVA, za bardzo trafną należy uznać uwagę Autora o potencjalnej przyczynie ujemnych testów skórnych z jadem u chorych z HVA, którą

jest niepełna reprezentacja poszczególnych alergenów głównych w ekstraktach jadu poszczególnych producentów. Najnowsze dane wskazują na taką możliwość, determinującą zarówno porażki diagnostyczne, jak terapeutyczne. Zgadzam się również z poglądem Autora na nieetyczność wykonywania próby prowokacji z żywym owadem u pacjentów z HVA przed podjęciem immunoterapii, chociaż przygotowane do publikacji stanowisko ekspertów europejskich problem ten traktuje bardziej liberalnie i prezentuje inne podejście.

Cele pracy sformułowane są jasno i są w pełni uzasadnione niedostatkiem wiedzy na podejmowany temat. Pierwszym celem badania było wyłonienie czynników wpływających na nasilenie objawów HVA oraz skuteczność i bezpieczeństwo immunoterapii jadem owadów. Drugim celem było wytypowanie genów, których ekspresja różnicuje zdrowych i pacjentów z HVA oraz tych, które zmieniają ekspresję w przebiegu VIT. Cel pierwszy realizowano przez ocenę ankietową 127 pacjentów aktualnie poddawanych VIT jadem i 119 ocenianych retrospektywnie po zakończeniu immunoterapii. Cel drugi zrealizowano badając ekspresję wytypowanych genów u 38 osób zdrowych oraz 45 osób z objawami HVA na jad osy poddanych immunoterapii jadem osy.

Doktorant poddał analizie dość liczną grupę pacjentów diagnozowanych i leczonych w Klinice Alergologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Gdańsku, jednym z wiodących w kraju ośrodku zajmującym się problemami alergii na jad owadów błonkoskrzydłych. Zarówno doświadczenie ośrodka, jak jego osiągnięcia naukowe nie pozostawiają wątpliwości, że proces diagnozowania i kwalifikacji do VIT pacjentów stanowiących bazę dla Doktoranta był prawidłowy, a wybór metod i przeprowadzanie poszczególnych procedur zgodny z wytycznymi (co znajduje odbicie w opisie przez Autora procedur wykorzystanych w diagnostyce HVA). Tym samym nie ma wątpliwości, że oceniana przez lek. med. Karola Kempińskiego grupa pacjentów z HVA pozwalała na zrealizowanie założonych celów pracy. Jedyne co wymaga moim zdaniem uzupełnienia w sekcji pracy „Materiały i Metody", to kryteria wyłączenia z badania, które są w moim przekonaniu niekompletne, nie zawierają bowiem wszystkich bezwzględnych przeciwskazań do VIT, a to m.in. chorób nowotworowych, zdekompensowanej niewydolności serca, aktywnych procesów infekcyjnych i autoimmunologicznych. To zastrzeżenie ma charakter formalny, bo w moim przekonaniu żaden z takich pacjentów nie byłby kwalifikowany do VIT w ośrodku, który reprezentuje Autor.

Powracając do tematu i metodologii pracy, szerszego komentarza wymaga sposób oceny przez Autora skuteczności VIT. Można by sądzić, że problem skuteczności VIT jest bezdyskusyjny, bo został definiowany jako prewencja systemowej reakcji alergicznej i

udokumentowany dostatecznie wynikami jednej metaanalizy i dwóch przeglądów systematycznych. To prawda, ale już wielkość efektu terapeutycznego budzi kontrowersje. Na podstawie opublikowanych dotychczas badań, powodzenie VIT mieści się w przedziale od 64 do 100%. Autor podejmuje temat wielkości efektu terapeutycznego VIT określając średnią wielkość reakcji poużądleniowej oraz różnicę stosunku reakcji łagodnych do ciężkich systemowych w grupach pacjentów z HVA przed i po VIT. Autor posługuje się zatem oryginalną i nie wykorzystywaną dotychczas metodą, która powinna być bardziej szczegółowo opisana w sekcji metodologicznej, a nie dopiero w dyskusji.

Walorami badania są: liczebność grupy badanej (N=264), jej jednorodność (do VIT kwalifikowano tylko dorosłych pacjentów z ciężką reakcją systemową: HVA-SYS III° i IV°;) oraz analogiczny sposób leczenia wszystkich pacjentów poddanych ocenie (przez 5 lat, tą samą szczepionką). Co więcej, ocena opiera się na relacji pacjenta z przebiegu „użądlenia polnego", co według niektórych autorów jest lepszym wariantem oceny niż ocena „użądlenia prowokacyjnego". Podzielam ten pogląd. Użądlenie polne przebiega w warunkach naturalnych. Zarówno owad, jak pacjent nie są poddani wpływom modyfikującym ich zachowania. Natomiast próba prowokacji, której niewątpliwą przewagą jest pewna identyfikacja owada i obiektywna ocena objawów, dotyczy pacjenta „przygotowanego", zdrowego, u którego wykluczono wszelkie możliwe przeciwskazania i starannie wyeliminowano znane kofaktory anafilaksji.

Wadą badania w części dedykowanej pierwszemu celowi pracy jest, poza retrospektywnym charakterem (właściwym jednak większości takich analiz), jego jednoośrodkowy charakter i mała liczba użądleń podczas i po zakończeniu VIT (N=53). Co więcej, wobec przyjętego przez Autora sposobu oceny, opartego na porównaniu średniej wielkości reakcji poużądleniowych przed VIT w całej badanej grupie ze średnią ich wielkością u osób, które miały powikłania w trakcie oraz przebyły użądlenie polne po VIT, z kalkulacji średniej wielkości HVA-SYS przed VIT powinno być wyłączone pierwsze użądlenie, jako takie, które z definicji traktowane jest jako „uczulające" i powinno być bezobjawowe. Sądzę również, że do oceny skuteczności VIT powinni być kwalifikowani tylko ci pacjenci, którzy mieli powikłania podczas VIT oraz ci, którzy po VIT zostali użądleni.

Analiza osobniczych czynników ryzyka reakcji uogólnionej po użądleniu jest wnikliwa i przejrzyście przedstawiona. Przenalizowano i zilustrowano graficznie wpływ czynników demograficznych (wiek, płeć), współistniejących schorzeń (choroby układu sercowo-naczyniowego, zażywane leki z grupy ACE- i betablokerów) oraz przebiegu użądlenia (gatunek owada na ciężkość reakcji poużądleniowej.

Ostatecznie Doktorant wykazał skuteczność VIT u 93,8% leczonych, co jest zgodne z wynikami innych autorów. W oparciu o wymienione powyżej czynniki ryzyka, Doktorant wykazał związek powodzenia VIT z rodzajem jadu stosowanego podczas VIT (niższa dla odczulanych jadem pszczoły), stężeniem tryptazy mastocytarnej (niższa u osób z wyższymi wartościami BT) oraz czasem trwania VIT (wyższa u dłużej odczulanych), co również zgodne jest z dotychczasowymi ustaleniami. Odnosząc się do dyskusji na temat udziału leków z grupy ACE i betablokerów w powodzeniu i niepowodzeniu VIT, Autor bardzo słusznie wyraża pogląd o braku możliwości definitywnej oceny wpływu tych preparatów na skuteczność VIT, ponieważ zgodnie z obowiązującymi dotychczas (tj. do 2015 roku) kryteriami EAACI zarówno w ośrodku gdańskim, jak i wrocławskim leki te odstawiano i zastępowano alternatywnymi, traktując ich stosowanie jako bezwzględne przeciwskazanie do VIT.

Drugi cel pracy został zrealizowany przy pomocy metod nie budzących żadnych wątpliwości merytorycznych. W oparciu o dotychczasowe doświadczenia Ośrodka, badanie ekspresji genów metodą RT=PCR z zastosowaniem kart mikrocieczowych przeprowadzono na kilkunastu genach wytypowanych uprzednio. Ekspresję genów oceniano w dwóch grupach: pacjentów z HVA i zdrowych oraz pacjentów z HVA przed i po VIT. Autor wykazał różnicę ekspresji 12 genów mających udział w procesie szeroko rozumianego „zapalenia" pomiędzy osobami zdrowymi, a pacjentami z HVA-SYS. Ponadto, Autor wskazuje na zmniejszenie ekspresji genu COMMD8, kluczowego dla aktywacji białek czynnika transkrypcyjnego NFkappaB procesów zapalnych, jak i szeregu innych procesów niedostatecznie jeszcze zdefiniowanych. Ta część pracy jest dla mnie szczególnie intrygującą, ponieważ stymuluje do dalszych badań ukierunkowanych wynikiem pracy.

W dyskusji Doktorant konfrontuje wyniki badań własnych z wynikami innych autorów. Dane te, odnośnie poszczególnych czynników ryzyka HVA, jak i skuteczności VIT, są dość zróżnicowane, co wykazuje i słusznie podkreśla Autor. Dyskusja jest interesująca i logiczna. Całość dyskusji dowodzi dobrej znajomości teorii i praktyki alergii na jad owadów.

Rozprawa kończy się trzema wnioskami, które są uprawnione wynikami badań własnych.

Piśmiennictwo obejmuje 275 pozycji uszeregowanych według kolejności cytowań. Dominują publikacje z ostatnich lat. Piśmiennictwo jest cytowane poprawnie. Sugerowałabym jedynie korektę błędów w kilku pozycjach (21, 55,123, 206, 209, 213, 220, 221, 273).

Podsumowując stwierdzam, że praca będąca przedmiotem niniejszej recenzji stanowi ważną pozycję wśród badań nad alergią na jad owadów. Cel pracy został w pełni zrealizowany. Rozprawa stymuluje do dalszych badań. Na podstawie tej dysertacji można wnioskować, ze

Autor – lekarz medycyny Karol Kempiński jest przygotowany do prowadzenia badań naukowych.

W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku wniosek o dopuszczenie lek. med. Karol Kempiński do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med Marita Nittner-Marszalska