

Szczecin 10.09.2023

Prof. dr hab. n. med. Grażyna Czaja-Bulsa
Katedra i Zakład Chorób Dzieci i Pielęgniarstwa Pediatrycznego
Wydział Nauk o Zdrowiu
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
71-210 Szczecin, ul. Żołnierska 48
Tel. 091- 48 00 951; tel/fax. 091 48 00 952



RPW/8615/2023
Data: 2023-09-28
UMB

**Ocena rozprawy na stopień doktora nauk o zdrowiu
lekarza medycyny Magdaleny Beaty Pawłowicz
z Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i
Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku**

**pt.: „Ocena stężenia interleukiny-10 oraz uczulenia na komponenty alergenowe
pyłków roślin u dzieci z alergią na pokarmy”.**

Choroby alergiczne są chorobami powszechnymi, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych, których częstość systematycznie wzrasta. Alergia pokarmowa jest ich pierwszą manifestacją w wieku niemowlęcym, w latach późniejszych może występować jako kolejna postać alergii.

Temat podjęty przez Doktorantkę dotyczy zatem bardzo ważnego zagadnienia, aktualnie coraz częściej dyskutowanego w piśmiennictwie. W opinii recenzenta przedstawiona praca w istotny sposób poszerza wiedzę o alergii pokarmowej w grupie pacjentów pediatrycznych.

Układ pracy jest zgodny z powszechnie przyjętymi zasadami redagowania prac naukowych. Praca liczy 104 strony wydruku komputerowego, zawiera 28 rycin, 18 tabel oraz 139 pozycji piśmiennictwa, w większości obcojęzycznego, zamieszczonego w kolejności alfabetycznej. Została podzielona na 10 klasycznych rozdziałów, w tym streszczenie w języku polskim i angielskim oraz dodatkowo w zestawienie używanych skrótów, spis tabel i rycin oraz aneks zawierający wniosek oraz zgodę Komisji Bioetycznej UM w Białymstoku na przeprowadzenie badań.

"Wstęp" liczy 20 stron. Został podzielony na 7 podrozdziałów, w których Autorka przedstawia definicję niepożądanych reakcji na pokarmy, mechanizmy immunologiczne i manifestację kliniczną alergii na pokarmy, charakteryzuje alergeny pokarmowe i pyłkowe (w tym komponenty alergenowe) i ich znaczenie kliniczne.

Wyjaśnia znaczenie alergii krzyżowej. Następnie omawia metody stosowane w diagnostyce alergii IgE-zależnej: punktowe testy skórne (SPT), alergenowo swoiste przeciwciała IgE (asIgE), doustną otwartą próbę prowokacji pokarmowej (OFC), test aktywacji bazofilów i diagnostykę molekularną. W ostatnim podrozdziale wstępu opisuje interleukiny, zwłaszcza interleukinę-10 (IL-10) i transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF- β 1).

W rozdziale drugim, zatytułowanym „Cele pracy i ich uzasadnienie” Doktorantka prawidłowo sformułowała trzy cele badawcze:

1. Ocena stężenia IL-10, TGF- β 1 oraz uczulenia na komponenty alergenów pyłkowych w prognozowaniu ryzyka wystąpienia reakcji systemowych u dzieci z alergią na pokarmy.
2. Analiza profilu uczulenia na komponenty alergenów pyłków roślin u dzieci z alergią na pokarmy.
3. Ocena związku objawów klinicznych alergii na pokarmy z uczuleniem na komponenty pyłków roślin.

Postawione cele Doktorantka realizowała prowadząc badania u 67 dzieci w wieku od 2 do 14 lat; 43 dzieci należało do grupy badanej, a 24-czworo do grupy kontrolnej. Ich charakterystykę przedstawiła w pierwszym podrozdziale rozdziału trzeciego zatytułowanego „Pacjenci i metody badawcze”, który zajmuje jedną stronę oraz w początkowej części podrozdziału pierwszego rozdziału „Wyniki badań”.

Grupę badaną stanowiło 43 dzieci z alergią pokarmową znajdujących się pod stałą opieką Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Alergologii Dziecięcej lub Przyklinicznej Poradni Alergologicznej.

IgE-zależna alergia na pokarmy była u nich rozpoznana na podstawie objawów klinicznych, dodatniego wyniku doustnej próby prowokacji pokarmowej oraz kryteriów laboratoryjnych:

1. dodatni wynik SPT z alergenami pokarmowymi i obecność asIgE w surowicy w stężeniu $>0,7$ kU/L na powyższe alergeny,
2. dodatni wynik SPT z alergenami pyłków roślin i obecność asIgE w surowicy w stężeniu $>0,7$ kU/L na powyższe alergeny.

Dzieci z grupy kontrolnej były również pacjentami Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Alergologii Dziecięcej UM w Białymstoku. Hospitalizowano je z powodu zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego. Badaniami alergologicznymi wykluczono u nich uczulenie na alergeny pokarmowe i wziewne w mechanizmie IgE-zależnym (asIgE $<0,35$ kU/L).

Kryterium wykluczenia z badań było współistnienie innych chorób, takich jak: pasożytniczych, autoimmunologicznych, układu oddechowego o podłożu innym niż alergiczne oraz pacjentów leczonych steroidami systemowymi w okresie prowadzenia badania.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nr R-I-002/160/2016. Pacjentów

kwalifikowano do badań po uzyskaniu świadomej zgody opiekuna prawnego dziecka, zarówno z grupy badanej, jak i kontrolnej.

W podrozdziale 2, rozdziału trzeciego pt. "Metodyka badań" Doktorantka omówiła stosowane metody badań.

U wszystkich dzieci, jako pierwszy etap, przeprowadzono retrospektywną analizę danych z badania podmiotowego i przedmiotowego ze szczególnym uwzględnieniem manifestacji klinicznej alergii na pokarmy, w tym z uwzględnieniem wyników doustnej próby prowokacji pokarmowej.

Rozpoznanie anafilaksji na pokarm stawiano u dzieci na podstawie zgromadzonej dokumentacji medycznej.

W drugim etapie badań wykonano badania alergologiczne, zarówno u pacjentów z grupy badanej jak i kontrolnej. Były to:

- 1/ SPT z alergenami pokarmowymi i powietrzno pochodnymi,
- 2/ asIgE na alergeny pokarmowe i powietrzno pochodne metodą PolyCheck i komponenty pyłków roślin (brzozy Bet v 2, ambrozji Amb v 8 i bylicy rArt v 4) metodą ELISA (współpraca z Zakładem Alergologii i Immunologii Doświadczalnej UM w Białymstoku),
- 3/ stężenie IL-10 i TGF- β 1 w surowicy.

SPT wykonano metodą „prick by prick” zgodnie ze standardami opracowanymi przez EAACI. Dla pokarmów wykorzystano alergeny natywne: mleka, białka i żółtka jaja kurzego, ryby, pszenicy, wieprzowiny, wołowiny, kury, banana, pomarańczy, jabłka, sezamu i orzechów arachidowych. Dla alergenów powietrzno pochodnych stosowano standaryzowane roztwory firmy Allegopharma zawierające alergeny roztoczy kurzu domowego, sierści kota, psa, pyłków traw, żyta, drzew I i II, chwastów, Alternaria i Cladosporium.

Metodą PolyCheck (Biocheck, GmbH, Münster, Niemcy)znaczono asIgE dla 20 alergenów pokarmowych i powietrzno pochodnych: białko mleka krowiego, białko jaja, żółtko jaja, soja, ryż, orzeszki ziemne, mieszanka mąki, orzech laskowy, jabłko, dorsz, pyłek brzozy, olchy, tymotki, bylicy, roztocze kurzu domowego i mączne, Cladosporium herbarum, Aspergillus fumigatus, naskórek kota i psa.

Stężenie IL-10 i TGF- β 1 w surowicy oznaczono za pomocą komercyjnego zestawu ELISA (Immuniq, Abbotec) i testów firmy Diaclone.

Próby prowokacji pokarmowej wykonywano metodą otwartą pod nadzorem lekarza, w warunkach szpitalnych w pomieszczeniu przygotowanym do przerwania reakcji anafilaktycznej. Za wynik dodatni uznano występowanie objawów niepożądanych do 1-2 godzin od podania pierwszej porcji pokarmu dla reakcji IgE-zależnych i co najmniej po 2 godzinach - dla reakcji IgE-niezależnych.

Do oceny analizowanych wyników badań Doktorantka zastosowała dobrze dobrane, nowoczesne metody statystyczne, o czym pisze w rozdziale 4. Analizy statystyczne zostały przeprowadzone z wykorzystaniem programu komputerowego STATISTICA 13.1. Dla porównania danych o charakterze zmiennych

jakościowych użyto testu Manna-Whitney'a, a dla zmiennych ilościowych testu t-Studenta. Za poziom istotności przyjęto wartość $p < 0,05$.

Następny rozdział pracy, obejmujący 24 strony, zatytułowany jest "Wyniki badań". Doktorantka szczegółowo omawia w nim uzyskane wyniki przedstawiając je także na 26 rycinach i w 14 tabelach. Rozdział składa się z 3 podrozdziałów.

W podrozdziale 1, obejmującym 18 stron, zatytułowanym „Charakterystyka badanych grup pacjentów” Doktorantka opisała cechy typowe dla wydzielonych grup pacjentów.

Grupa badana (grupa B) składała się z 43 dzieci, a grupa kontrolna (grupa K) – 24 dzieci. Grupy były dopasowane pod względem wieku ($p=0,214$), płci ($p=0,193$ dla płci męskiej i $p=0,051$ dla płci żeńskiej) oraz występowania chorób alergicznych w rodzinach ($p=0,106$).

Na podstawie zebranych retrospektywnie danych z dokumentacji medycznej grupę badanych dzieci (grupę B) podzielono na dwie podgrupy:

- podgrupę A+: dzieci, u których w przeszłości wystąpiła reakcja anafilaktyczna na pokarm,
- podgrupę A-: dzieci, u których w przeszłości nie wystąpiła reakcja anafilaktyczna na pokarm.

W każdej z podgrup wydzielono kolejne dwie podgrupy: uczulonych (P+) i nieuczulonych (P-) na profiliny pyłków roślin.

Najczęściej uczulającymi alergenami pokarmowymi pochodzenie roślinnego były alergeny orzecha ziemnego, soi, orzecha laskowego i jabłka, natomiast zwierzęcego – alergeny mleka krowiego, jajka kurzego oraz ryby. W grupie A+ częściej dzieci były uczulone na alergeny ryby, orzecha ziemnego oraz soi ($p < 0,05$); uczulenie na pozostałe alergeny nie wykazywało różnic istotnych statystycznie. W grupie A+ częściej stwierdzano występowanie reakcji krzyżowych.

Najczęściej uczulającymi alergenami wziewnymi były alergeny pyłków drzew, roztocza kurzu domowego i pyłków traw. Dzieci z grupy A+ częściej były uczulone na alergeny pyłków traw, chwastów oraz roztocze kurzu domowego.

Najczęstszą manifestacją kliniczną było atopowe zapalenie skóry (88%), alergiczny nieżyt nosa (65%) i astma oskrzelowa (58%). Dzieci najczęściej były uczulone na mleko krowie (46,5%), jajko kurze (44,2%) i orzechy ziemne (41,9%). Reakcje anafilaktyczne po spożyciu pokarmów rozpoznano u 11 dzieci (26%), a zespół pyłkowo-pokarmowy u 7 dzieci (16%). Częstość występowania tych chorób nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy podgrupą A+ i A-, tylko anafilaksja i zespół pyłkowo-pokarmowy były istotnie częstsze w grupie A+ ($p < 0,05$).

Objawy anafilaksji najczęściej wyzwalano spożycie mleka (54,5%), rzadziej orzechów ziemnych (18,2%), rzadko jajka kurzego, jabłka lub gruszki (po 9,1%). Najczęstszymi objawami była duszność i pokrzywka, 2-krotnie rzadziej występowały wymioty i ból brzucha, 4-krotnie rzadziej obrzęk twarzy, sporadycznie świąd jamy ustnej lub biegunka.

U 2 dzieci z 11-stu z objawami anafilaksji po spożyciu mleka krowiego stężenia komponent alergenów były niskie, występowanie tego zjawiska nie zostało wyjaśnione w pracy.

U 8 dzieci (18,6%) potwierdzono uczulenie na profiliny pyłków roślin. W tej grupie pacjentów częściej występowała anafilaksja. W grupie P+ anafilaksja występowała tylko po pokarmach zwierzęcych, a w grupie P- po obu rodzajach pokarmów. U dzieci z grupy P+ częściej uczulenie na pokarmy roślinne było bezobjawowe.

Pacjenci z grupy P+ byli istotnie częściej niż pacjenci z grupy P- uczuleni na alergeny rekombinowane mleka krowiego: Bos d 4, Bos d 5, Bos d 8. Wszystkie dzieci, u których anafilaksja była następstwem spożycia mleka krowiego miały obecne asIgE dla kazeiny (Bos d 8). U dzieci z anafilaksją po spożyciu jaja kurzego najwyższe stężenia as IgE stwierdzano dla owomukoidu (Gal d 1).

Stężenie IL-10 było istotnie statystycznie niższe w grupie dzieci z reakcją anafilaktyczną w wywiadzie niż w grupie kontrolnej. Nie wykazano różnic pomiędzy grupą A+ i A-. Niższe stężenia stwierdzono u dzieci reagujących po pokarmach roślinnych.

Stężenie TGF- β 1 w grupie pacjentów z grupy A+ było istotnie statystycznie wyższe niż w grupie A- i grupie kontrolnej. Nie wykazywało różnic pomiędzy dziećmi z reakcjami anafilaktycznymi w wywiadzie po pokarmach roślinnych i zwierzęcych.

Kolejny rozdział pracy nosi tytuł „Dyskusja”, liczy 24 strony. Doktorantka przeprowadziła w nim wnikliwą analizę własnego materiału klinicznego i porównała go z danymi wynikającymi z zebranego piśmiennictwa. Uzyskane wyniki i dane z piśmiennictwa pozwoliły jej stwierdzić, że dzieci w średnim wieku 7,5 lat, z rejonu białostockiego, najczęściej były uczulone na orzechy ziemne, mleko krowie, jajko kurze i sezam. Natomiast reakcje anafilaktyczne najczęściej wyzwalano u nich mleko, rzadziej jajko kurze i orzechy ziemne. Dzieci z anafilaksją na mleko krowie i niezależnie grupa uczulona na pyłki roślin najczęściej były uczulone na kazeinę (Bos d 4). Nie stwierdzono zależności pomiędzy częstością występowania zespołu pyłkowo-pokarmowego oraz innych objawów alergii a uczuleniem na profiliny pyłków roślin. Anafilaksja występowała częściej w grupie dzieci uczulonych a pyłki, różnica dotyczyła tylko reakcji po pokarmach pochodzenia zwierzęcego. U dzieci uczulonych na pyłki roślin nie stwierdzono anafilaksji po pokarmach zawierających alergeny reagujące krzyżowo z pyłkami. Wykazano ponadto, że dzieci u których wystąpiła anafilaksja, miały niższe stężenie IL-10 i wyższe stężenie TGF- β 1.

Rozdział 6-ty nosi tytuł „Wnioski”. Autorka sformułowała 3 wnioski, które brzmią:

1. Uczulenie na profiliny pyłków roślin nie wpływa w istotny sposób na spectrum uczulających alergenów i manifestację kliniczną alergii na pokarmy; z wyjątkiem anafilaksji po pokarmach pochodzenia roślinnego, której nie stwierdzono w tej grupie chorych.
2. Pacjenci z anafilaksją indukowaną pokarmem charakteryzują się niższym stężeniem IL-10 oraz wyższym stężeniem TGF- β 1 w krwi.
3. Uzyskane wyniki wskazują na obiecujące znaczenie jednoczesnego oznaczania stężenia obu powyższych cytokin w prognozowaniu ryzyka wystąpienia reakcji systemowych u dzieci z alergią na pokarmy.


Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam, że Autorka osiągnęła postawione sobie cele. W ocenie recenzenta z postawionego sobie zadania wywiązała się bardzo dobrze.

Wśród wymienionych zalet recenzowanej pracy recenzent zauważa drobne usterki w redakcji pracy, które Autor może usunąć przed oddaniem pracy do druku:

- strona 5 linia 3 – brak słowa „pokarmowa” za słowem alergia,
- strona 31 linia 5 od dołu – brak określenia gatunku, wiemy że w testach natywnych stosowano rybę, ale jaką?
- strona 31 linia ostatnia – brak pełnej nazwy stosowanych odczynników: podano tylko Alternaria i Cladosporium
- strona 40, linia 3 od dołu – pomyłony procent, powinno być 19 (59,37%),
- strona 87, linia 20 – nieprawidłowa ilość dzieci w grupie kontrolnej, jest 35 a powinno być 24.

Wszystkie poczynione uwagi nie pomniejszają wartości rozprawy. Wykonana przez Doktorantkę praca dowiodła, że posiada ona odpowiednio duży zasób wiedzy i potrafi podjąć dyskusję naukową z innymi autorami zbliżonych tematycznie doniesień wykazanych w zebranych piśmiennictwie i cytowanych w pracy.

Uważam, że rozprawa doktorska lekarza medycyny Magdaleny Pawłowicz z Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pt.: „Ocena stężenia interleukiny-10 oraz uczulenia na komponenty alergenowe pyłków roślin u dzieci z alergią na pokarmy” odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim. Przedkładam zatem Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie lekarza medycyny Magdaleny Pawłowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chorób Dzieci
i Pielęgniarstwa Pediatrycznego

prof. dr hab. n. med. Grażyna Czaja-Bulska