

OCENA
pracy na stopień doktora nauk medycznych
lek. Alicji Adaszewskiej
p.t.” Diagnostyka autoimmunologicznych chorób
pęcherzowych skóry w oparciu o obraz kliniczny i
nowoczesne metody immunologiczne”

Autoimmunologiczne choroby pęcherzowe skóry stanowią odrębny dział dermatologii zajmujący się diagnostyką i leczeniem tych chorób w oparciu o zupełnie inny warsztat laboratoryjny i odrębne metody terapeutyczne niż inne choroby występujące w dermatologii i immunologii klinicznej. Dlatego też zajmowanie się tymi chorobami przez dermatologów jest uzasadnione historycznie i zwyczajowo. Patrząc na różnorodność kliniczną tych chorób dotyczą wszystkich grup wiekowych i płci obojga diagnostyka laboratoryjna tych chorób jest trudna, tym bardziej że obraz kliniczny może być bardzo podobny, a badanie histologiczne wskazuje jedynie na miejsce tworzącego się pęcherza, odczyn zapalny i ma takie samo znaczenie pomocnicze, jak obraz kliniczny i wywiad. Na szczęście najnowsze technologie diagnostyczne bardzo zwiększyły czułość i swoistość wyników laboratoryjnych, na podstawie których można postawić ostateczne rozpoznanie. Diagnostyką tych chorób nie może zajmować się żadne laboratorium analityczne, ponieważ wynik ujemny badania wymaga czasem kilkukrotnych powtórzeń biopsji czy badania surowicy do prawidłowego postawienia diagnozy, czego nie mają w zwyczaju robić zwykle laboratoria, a wręcz za każde badanie powtórzone z powodu błędnego wykonania i fałszywie ujemnego wyniku, trzeba płacić. Ponieważ wszystkie te metody znam osobiście i są one dostępne w naszej Pracowni Immunodermatologii w Katedrze i Klinice Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową Miejskiego Szpitala Zespołonego i Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego sądzę, że moja recenzja będzie obiektywna i rzeczowa.

Stąd też przygotowanie przez lek Alicję Adaszewską pod kierunkiem promotora prof. dr hab. med. Cezarego Kowalewskiego cyklu publikacji dotyczących diagnostyki autoimmunologicznych chorób pęcherzowych skóry, a w szczególności pemphigoidu pęcherzowego i pęcherzyc w oparciu o obraz kliniczny i nowoczesne metody immunologiczne

w ramach grantu „Prospektywne badanie przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom rozpoznawanym przez autoprzeciwciała od chorych na autoimmunizacyjne choroby pęcherzowe skóry oraz badanie genetycznej podatności na zachorowanie” uważam za bardzo cenny pomysł.

Do recenzji zostały przedstawione 3 prace o łącznej punktacji IF 4,635 oraz MNiSW 210. Prace te przed dopuszczeniem do druku były oczywiście recenzowane, są napisane w języku angielskim, a cykl publikacji na stopień doktora stanowi doskonale studium wymienionych problemów pod wspólnym tytułem „Diagnostyka autoimmunologicznych chorób pęcherzowych skóry w oparciu o obraz kliniczny i nowoczesne metody immunologiczne”. Na ten cykl składają się 3 prace, w których Alicja Adaszewska jest pierwszym autorem, a Jej promotor prof. Cezary Kowalewski ostatnim. Wszystkie 3 artykuły zostały opublikowane w renomowanych czasopismach: *Journal of Immunological Methods*, *Journal of Cutaneous Pathology* i w *Postęпах Dermatologii i Alergologii*.

Układ pracy jest logiczny: strona tytułowa, słowa kluczowe, dedykacja i podziękowania wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską, wykaz stosowanych skrótów streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, 3 artykuły, podsumowanie i wnioski, piśmiennictwo, zgoda komisji bioetycznej, oświadczenia współautorów publikacji.

Cel pracy został sformułowany jasno i rozwinięty szczegółowo w 3 podpunktach. Celem pracy jako całości była walidacja nowego testu immunofluorescencyjnego – mozaiki BIOCHIP – i określenie zgodności diagnostycznej z metodami stosowanymi w rutynowej diagnostyce pemphigoidu i pęcherzycy, a także ich korelacja z obrazem klinicznym.

Pierwszym szczegółowym celem była analiza zgodności rozpoznawania klinicznych typów pęcherzycy z wynikami uzyskanymi w badaniach laboratoryjnych przy użyciu mozaiki BIOCHIP w porównaniu do pośredniego badania IF i testu ELISA

Drugim celem była analiza zgodności rozpoznawania klinicznego pemphigoidu wynikami uzyskanymi w badaniach laboratoryjnych przy użyciu mozaiki BIOCHIP w porównaniu do pośredniego badania IF i testu ELISA

Trzecim celem było określenie przydatności mozaiki BIOCHIP w diagnostyce autoimmunologicznych chorób pęcherzowych w świetle wyników badań i przeglądu literatury

W pierwszym artykule, pracy oryginalnej pt. „*The use of BIOCHIP technique in diagnosis of different types of pemphigus: vulgaris and foliaceus*” opublikowanym w roku 2019 autorzy przedstawili zastosowanie testu BIOCHIP w diagnostyce pęcherzycy zwykłej i liściastej. W badaniu wzięło udział 35 pacjentów, którzy zostali podzieleni na pacjentów ze śluzówkową postacią pęcherzycy zwykłej (m-PV), skórno-śluzówkową postacią pęcherzycy

zwykłej (mc-PV) oraz z pęcherzyką liściastą (PF). Wszyscy pacjenci charakteryzowali się typowym obrazem klinicznym (obecnością nadżerek na skórze i (lub) śluzówkach), dodatnim wynikiem DIF i IIF oraz w teście ELISA obecnością przeciwciał przeciwko Dsg3 w przypadku pęcherzycy zwykłej oraz przeciwko Dsg1 w przypadku pęcherzycy liściastej. Wszyscy pacjenci biorący udział w badaniu mieli aktywną pęcherzycę: przed rozpoczęciem leczenia, w początkowym okresie choroby lub w okresie nawrotu. Grupę kontrolną stanowiły surowice 44 pacjentów: 24 chorych na pemfigoid pęcherzowy oraz 4 osoby zdrowe. Surowice pacjentów zostały przebadane testem BIOCHIP (Dermatological Mosiac 7, Euroimmun, Lubeka, Niemcy), ocenie poddano 3 z 6 części mozaiki – tj. przełyk małpy, komórki HEK293 transfekowane Dsg1 oraz komórki HEK293 transfekowane Dsg3. Wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem programu STATISTICA 13.1. W publikacji po raz pierwszy przedstawiono wynik z podziałem na grupy i podtypy pęcherzycy, w przeciwieństwie do dotychczasowych prac, niestosujących takiego podziału. Czułość przełyku małpy na mozaice BIOCHIP oceniono na 81% w grupie PV, w tym 76,9% w grupie m-PV i 87,5% w grupie mc-PV oraz na 42,9% w grupie PF. Autorzy sugerują, że niższa czułość przełyku małpy na BIOCHIPIE niż wykonywana klasycznie może wynikać z utrwalenia substratu, zastosowania tylko jednego rodzaju substratu czy też pojedynczego rozcieńczenia 1:10. Czułość Dsg-3 na BIOCHIPIE oceniono na 100% w grupie PV oraz na 0% w grupie PF – identyczną czułość uzyskano w badaniu ELISA na Dsg-3. Czułość Dsg-1 na BIOCHIPIE wyniosła 92,9% dla PF, 15,4% dla m-PV oraz 87,5% dla mc-PV. Swoistość wszystkich substratów ocenili autorzy na 100%. Uzyskane wyniki walidacji odniesiono do prac innych autorów. Zwrócono uwagę na fakt, że BIOCHIP można uznać za bardzo czułą i swoistą metodę, znacznie ułatwiającą i skracającą proces diagnostyczny. Policzono również współczynnik Kappa Cohena dla badania BIOCHIP Dsg-1 oraz ELISA Dsg-1, uzyskując bardzo dużą zgodność pomiędzy badaniami (1,0 dla mPV oraz 0,91 dla mcPV). Uzyskane wyniki wskazują na to, że BIOCHIP może być metodą dla różnicowania nie tylko PV z PF, ale – co jest pionierską obserwacją – umożliwiała różnicowanie pomiędzy m-PV i mc-PV.

W drugim artykule, który również jest pracą oryginalną pt. *„The use of BIOCHIP mosaics in diagnostics of bullous pemphigoid: Evaluation and comparison to conventional multistep procedures”*, opublikowanym w „Journal of Cutaneous Pathology” również w 2019r, Doktorantka wraz ze współautorami przedstawia zastosowanie mozaiki BIOCHIP w diagnostyce pemfigoidu pęcherzowego. W badaniu wzięło udział 51 pacjentów chorych na BP, którzy charakteryzowali się typowymi objawami klinicznymi, obecnością liniowych złogów IgG i (lub) C3 wzdłuż błony podstawnej w DIF oraz dodatnim badaniem IIF na splicie skórnym

(salt split skin-SSS) i (lub) przelyku mały i (lub) dodatnim wynikiem w badaniu ELISA w kierunku BP180NC16a i (lub) BP230. Wszyscy pacjenci znajdowali się w aktywnej fazie choroby. Trzydziestu pięciu pacjentów z pęcherzycą oraz 4 zdrowych ochotników stanowiło grupę kontrolną. Surowicę pacjentów przebadano na mozaice BIOCHIP (Dermatological Mosiac 7, Euroimmun, Lubeka, Niemcy), analizując cztery z sześciu jej składowych – tj. przelyk mały, split skórny, rekombinowany antygen BP180NC16a, komórki HEK293 transfekowane BP230. Wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem programu STATISTICA 13.1 oraz IBM SPSS Statistics 25. Policzono czułość i swoistość poszczególnych części testu BIOCHIP oraz współczynnik Kappa Cohena pomiędzy poszczególnymi składowymi a odpowiadającymi im klasycznymi metodami. Analiza wykazała bardzo dobrą zgodność między BIOCHIP-SSS a klasycznym IIF-SSS (0,933, $P < 0,001$, oraz między BIOCHIP-BP230 a ELISA – BP230 (0,793, $P < 0,001$). Czułość BIOCHIP-ME wyniosła 51,0%, natomiast IIF-ME – 76,5%. Dodatnią reakcję w pokrywie pęcherza na BIOCHIPSSS stwierdzono u 94,1% pacjentów z BP i u wszystkich pacjentów na IIF-SSS (czułość 100%). Czułość BIOCHIP-BP180-NC16a była niższa niż w teście ELISA-BP180-NC16a (76,5% vs 82,4%), a czułość BP230 obu metod – podobna (45,1% vs 43,1%). Swoistość dla wszystkich antygenów wynosiła 100%. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że mozaika BIOCHIP jest bardzo przydatną metodą w diagnostyce BP, charakteryzującą się zadowalającą zgodnością z innymi technikami stosowanymi do wykrywania krążących przeciwciał. W publikacji przedstawiono analizę wyników nie tylko dla antygenów BP180-NC16a i BP-230, ale również – po raz pierwszy – szczegółowo opracowano wyniki dla ME i SSS (dotychczasowe prace analizowały tylko ME lub tylko SSS, lub substraty zbiorczo, bez rozróżnienia). W dyskusji odniesiono się do wyników prac innych autorów, które w większości były zgodne, aczkolwiek przedstawione w innym ujęciu. Test uznano za szybki, relatywnie tani, pozwalający na jednoczesne badanie zarówno małych, jak i większych grup pacjentów oraz niewymagający specjalistycznego wyposażenia laboratorium. W artykule, oprócz pozytywnych cech, przedstawiono również ograniczenia. W całościowej ocenie uznano test za przydatny i możliwy do stosowania zamiennie z klasyczną IIF czy metodą ELISA.

W trzecim artykule, pracy poglądowej pt. „*Diagnostics of autoimmune blistering disorders: an experience of a single tertiary referral center*”, przyjętym do druku/opublikowana w czasopiśmie 26 „*Advances in Dermatology and Allergology*” w 2020, stanowi podsumowanie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego diagnostyki AICHP. Obecnie uważa się, że szybkie i trafne postawienie diagnozy ma szczególne znaczenie z powodu konieczności włączenia odpowiedniego leczenia, a także współwystępowania niektórych

AICHP z nowotworami. Niestety, w dalszym ciągu diagnostyka ta jest trudna, wieloetapowa i często wymagająca badań w wysokospecjalistycznych ośrodkach. W pracy przedstawiono nowe możliwości diagnostyczne, takie jak mozaika BIOCHIP czy wielowariantowa ELISA, których niebywałym walorem jest usprawnienie i przyspieszenie diagnostyki, szczególnie u pacjentów charakteryzujących się nietypowym obrazem klinicznym. Zwrócono uwagę również na praktyczne aspekty, m.in. dokładnie opisano technikę pobierania i transportowania materiału do DIF oraz badań umożliwiających identyfikację antygeny z surowicy. Choroby podzielono na grupę pęcherzycy i chorób podnaskórkowych. Omówiono schemat diagnostyczny i typowe cechy każdej jednostki chorobowej. Zwrócono uwagę na fakt, że DIF w dalszym ciągu pozostaje złotym standardem diagnostyki AICHP. Opisano wzory fluorescencji w DIF oraz IIF na różnych substratach w poszczególnych AICHP. Podkreślono, w których jednostkach chorobowych ma znaczenie badanie histopatologiczne i jakie są jego typowe cechy.

Podsumowaniem przedstawionej rozprawy jest podkreślenie roli nowoczesnych testów autoimmunologicznych – w tym szczególności mozaiki BIOCHIP – w diagnostyce AICHP. Szeroko omówiono aktualne schematy diagnostyczne oraz zwrócono uwagę na fakt, że wraz z postępującym wzrostem zachorowalności szeroka dostępność do szybkich, tanich a także prostych w wykonaniu i interpretacji narzędzi jest warunkiem zapewnienia odpowiedniej opieki nad pacjentami z AICHP.

We wszystkich trzech pracach dyskusja była prowadzona prawidłowo, merytorycznie na bardzo dobrym poziomie. Świadczy o doskonałej orientacji w temacie oraz dobrej znajomości i wycuciu zagadnienia. Doktorantka umiejętnie omawia i interpretuje wyniki własne porównując z wynikami innych autorów, Dyskusje prowadzone są bardzo dojrzałe i w sposób niezwykle wyważony. Zaletą tych dyskusji jest umiejętność wyjaśnienia swoich wyników badań za pomocą danych z literatury.

Pracę kończą 3 wnioski, logicznie wynikające z wyników przeprowadzonych badań, stanowiące odpowiedzi na podjęte w celu pracy problemy i podkreślające przydatność wykorzystania tych badań do celów klinicznych. Wszystkie 3 wnioski mają olbrzymie znaczenie kliniczne wynikają z treści trzech przedstawionych na stopień doktora n. medycznych prac, dlatego pozwolę sobie na ich powtórzenie:

1. Mozaika BIOCHIP zastosowana w diagnostyce pęcherzycy okazała się metodą o wysokiej czułości i swoistości, porównywalnie z IIF i ELISA. Stwierdzono bardzo dużą zgodność pomiędzy ELISA-Dsg1 i BIOCHIP-Dsg1. Mozaika może być stosowana do diagnozowania pęcherzycy oraz różnicowania pomiędzy pęcherzycą liściastą a odmianą śluzówkową i skórno-śluzówkową pęcherzycy zwykłej.

2. Mozaika BIOCHIP, zastosowana w diagnostyce pemfigoidu, okazała się metodą o wysokiej czułości i swoistości. Stwierdzono bardzo dużą zgodność pomiędzy wynikami na ELISA-BP180NC16a i BIOCHIP-BP180NC16a oraz pomiędzy IIF na splicie skórnym i BIOCHIP-SSS, a także dużą zgodność pomiędzy ELISA-BP230 i BIOCHIP-BP230 oraz pomiędzy IIF na przelyku małpy i BIOCHIP-BP230, co świadczy o tym, że metody te mogą być stosowane zamiennie.

3. Wyniki badań własnych i analiza literatury upoważniają do stwierdzenia, że mozaika BIOCHIP ma dużą wartość w diagnozowaniu AICHP oraz może być używana zamiennie z IIF i testami ELISA. Jest narzędziem prostym, szybkim, tanim i niewymagającym skomplikowanego wyposażenia laboratorium, dzięki czemu ułatwia proces diagnostyczny.

Cytowane piśmiennictwo, głównie w języku angielskim, odpowiednio i właściwie dobrane pozycje, w zdecydowanej większości z ostatnich kilku lat, co świadczy o ciągłej aktualności i nowoczesności podjętego zagadnienia. Doktorantka i współautorzy wykazali się dobrą umiejętnością korzystania z bogatej literatury przedmiotu, zrećnie cytując właściwe pozycje piśmiennictwa. Piśmiennictwo jest cytowane dwukrotnie raz w pracach składających się na dorobek, a następnie jako bardzo bogate piśmiennictwo wykorzystane do wykonania, napisania i podsumowania tematu, jako całości, i składa się z 80, moim zdaniem, najważniejszych pozycji literatury światowej. Nie mam najmniejszych zastrzeżeń merytorycznych, dotyczących doboru metod badawczych ani interpretacji wyników.

Ogólnie oceniam rozprawę doktorską lek. Alicji Adaszewskiej bardzo wysoko. Sposób opracowania pracy, wykonanie badań, prowadzona dyskusja i opracowane wnioski świadczą o umiejętności prawidłowego zaplanowania badań i pracy w zespole. Prace składające się na pracę doktorską stanowią wartościowe studia badawcze dotyczące trudnego problemu właściwej diagnostyki autoimmunologicznych chorób pęcherzowych, tym bardziej, że przed uzyskaniem dostępu do mozaiki BIOCHIP i ELISA wiele badań diagnostycznych wychodziło fałszywie negatywnie zmuszając do wielokrotnego powtarzania badań zarówno DIF jak i IIF, bo jak wiadomo, bez tego nie można żadnej z tych chorób rozpoznać i właściwie leczyć.

Przedłożona do recenzji praca spełnia ustawowe warunki określone dla rozpraw doktorskich. Uzyskane wyniki świadczą o wyjątkowej przydatności tych badań w praktyce. W związku z powyższym mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o przyjęcie ocenionej pracy jako rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i dopuszczenie lek. Alicję Adaszewską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

