

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr. Kacpra Packiego pt.

**„Diagnostyka alergii pokarmowej u małych dzieci
z wykorzystaniem metod
proteomicznych i metabolomicznych”**

przygotowanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej
i Analitycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

promotor: prof. dr hab. Jan Matysiak

Podstawę przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej stanowi zbiór 4 spójnych tematycznie artykułów (3 oryginalnych i jednego pogładowego), opublikowanych w recenzowanych czasopismach o łącznym IF równym 15,5 i łącznej punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki wynoszącej 520. Załączone oświadczenia Współautorów jednoznacznie wskazują na wiodący wkład Doktoranta w powstanie publikacji.

Publikacje wchodzące w skład recenzowanej rozprawy to:

- 1) Packi Kacper, Matysiak Joanna, Matuszewska Eliza, Bręborowicz Anna, Matysiak Jan. Changes in Serum Protein-Peptide Patterns in Atopic Children Allergic to Plant Storage Proteins. **International Journal of Molecular Sciences** 2023;16;24(2):1804.
- 2) Packi Kacper, Matysiak Joanna, Klimczak Sylwia, Matuszewska Eliza, Bręborowicz Anna, Pietkiewicz Dagmara, Matysiak Jan. Analysis of the Serum Profile of Cytokines

Involved in the T-Helper Cell Type 17 Immune Response Pathway in Atopic Children with Food Allergy. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2022;19(13):7877.

- 3) Packi Kacper, Matysiak Joanna, Plewa Szymon, Klupczyńska-Gabryszak Agnieszka, Matuszewska Eliza, Rzetecka Natalia, Bręborowicz Anna, Matysiak Jan. Amino Acid Profiling Identifies Disease-Specific Signatures in IgE-Mediated and Non-IgE-Mediated Food Allergy in Pediatric Patients with Atopic Dermatitis. **Biomedicines** 2023;11(7):1919.
- 4) Packi Kacper, Rudek Alicja, Matysiak Joanna, Klimczak Sylwia, Matuszewska Eliza, Rzetecka Natalia, Matysiak Jan. Food Allergies and Parasites in Children. **Foods** 2023;12(13):2465.

Doktorant umiejętnie połączył wspomniane publikacje w jeden cykl, stanowiący rozprawę doktorską, który opatrzył wstępem wprowadzającym czytelnika w zagadnienia będące tematem przeprowadzonych badań.

Przedstawiony na początku rozprawy przebieg działalności naukowej Doktoranta wskazuje na kilkuletnie, lecz już bogate doświadczenie w zakresie diagnostyki i badań naukowych w dziedzinie alergologii, immunologii i parazytologii z uwzględnieniem wykorzystania w wyżej wymienionych obszarach metod biologii molekularnej. Ponadto, na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant w swojej działalności na Uczelni, jak i poza nią, dąży do łączenia działalności naukowej z gospodarką i przemysłem oraz angażuje się w popularyzację i promocję działań naukowobadawczych.

We wstępie do rozprawy Autor przedstawia ewolucję definicji pojęć z dziedziny alergologii, jak również zarys rozwoju metod diagnostyki chorób alergicznych. Szczególnie szeroko omówiona

została diagnostyka alergologiczna z wykorzystaniem metod opartych o zdobycze biologii molekularnej. Prezentując rolę proteomiki i metabolomiki w badaniach nad chorobami alergicznymi Autor wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy doktorskiej jednocześnie w sposób zwięzły, lecz zrozumiały i przekonujący uzasadniając zarówno podjęcie badań w zakresie będącym przedmiotem rozprawy, jak i dobór grup badanych i zastosowanych metod.

Wchodzące w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej artykuły oryginalne zostały już opublikowane w indeksowanych czasopismach co równoznaczne jest z pozytywną oceną wystawioną im przez recenzentów. Moje, przedstawione poniżej, uwagi stanowią więc nie tylko ocenę, ale także komentarz do poruszanych zagadnień. Głównym celem badań mgr. Packiego była analiza profilu uczulenia pacjentów pediatrycznych w wieku 0-5 lat z AZS oraz identyfikacja i analiza zmian w profilu metabolitów i białek we wspomnianej grupie pacjentów. Celem wdrożeniowym projektu było stworzenie precyzyjnego algorytmu diagnostycznego dla dzieci z AZS w wieku 0-5 lat z podejrzeniem alergii pokarmowej.

Szczegółowe cele badawcze projektu obejmowały:

- Analizę profilu uczulenia i historii choroby pacjentów w celu określenia najczęściej alergizujących molekuł pokarmowych istotnych klinicznie dla dzieci w wieku 0-5 lat z przewlekłymi objawami AZS
- Analizę profilu uczulenia na białka zapasowe roślin w grupie dzieci z AZS w wieku 0-5 lat oraz identyfikacja i analizę zmian w profilu białkowo-peptydowym pacjentów z wykorzystaniem spektrometrii MALDI-TOF
- Określenie profilu cytokin zaangażowanych w szlak odpowiedzi immunologicznej komórek Th17 u dzieci 0-5 lat z przewlekłymi objawami AZS i alergią pokarmową oraz identyfikację różnic w stężeniach cytokin zależnych od mechanizmu alergii

- Identyfikację i analizę zmian w profilu wolnych aminokwasów u pacjentów pediatrycznych w wieku 0-5 lat z AZS oraz IgE-zależną alergią pokarmową, IgE-niezależną alergią pokarmową lub bez alergii pokarmowej
- Analizę wzajemnych powiązań między alergią pokarmową i infestacją pasożytniczą u pacjentów pediatrycznych. Omówienie zagadnienia diagnostyki różnicowej obu schorzeń na podstawie dostępnych, najnowszych danych literaturowych w dziedzinie alergologii i parazytologii

Powyższe zagadnienia stanowiły cele badań opisanych w 3 pracach oryginalnych składających się na niniejszą rozprawę. Ponadto, w skład przedstawionej do oceny rozprawy włączona została praca poglądowa opublikowana w czasopiśmie „Foods” w roku 2023.

Publikacja 1 zawiera wyniki badań nad uczuleniami na białka zapasowe pochodzenia roślinnego w populacji pediatrycznej oraz wyniki analizy zmian w profilu białkowo-peptydowym u tych pacjentów. Uczulenie na białka zapasowe stanowi istotny problem kliniczny w alergologii ze względu na możliwość wystąpienia potencjalnie zagrażających życiu reakcji ogólnoustrojowych a także reakcji krzyżowych, często nieoczekiwanych, wynikających z podobieństwa budowy białek zapasowych pochodzących z różnych źródeł alergenów. Wyniki badań Doktoranta wskazują, że analiza proteomiczna może stanowić uzupełnienie - a niekiedy także alternatywę - w postępowaniu diagnostycznym u chorych z podejrzeniem alergii pokarmowej z uczuleniem na białka zapasowe pochodzenia roślinnego. Znaczenie omawianych wyników jest szczególnie warte podkreślenia w kontekście niepełnej dostępności testów diagnostycznych do oceny stężeń IgE swoistych dla niektórych białek zapasowych.

W **publikacji 2** mgr Packi przedstawia wyniki oceny profilu cytokin zaangażowanych w szlak odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th17 u dzieci z objawami atopowego zapalenia skóry i

alergią pokarmową. Analizowano grupy chorych zróżnicowane pod kątem charakteru objawów oraz ich możliwej patogenezы (IgE-zależnej bądź IgE-niezależnej) oraz grupę kontrolną. Analizowano stężenia cytokin zapalnych (IL-1 beta, IL-4, IL-17A, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, sCD40L i TNF-alfa) zaangażowanych w rozwój odpowiedzi immunologicznej zależnej od subpopulacji limfocytów Th17. Wykazano zwiększone surowicze stężenie wszystkich badanych cytokin w grupie dzieci z rozpoznaną IgE-zależną alergią pokarmową, jednak istotność statystyczną obserwowano jedynie w odniesieniu do IL-1 beta. Wyniki badań zawartych w tej publikacji pozwalają na wysunięcie interesującej sugestii dotyczącej wpływu IgE-zależnej alergii pokarmowej na zwiększenie ekspresji cytokin związanych z Th17-zależnymi mechanizmami odpowiedzi immunologicznej. Autor umiejętnie i dogłębnie dyskutuje uzyskane wyniki, w sposób właściwy umiejscawiając je w kontekście aktualnego stanu wiedzy. W omawianej publikacji zawarta jest także propozycja schematu umiejscowienia i roli IL-1 beta w patogenezie alergii pokarmowej u chorych na AZS. Autor w zaproponowanym schemacie łączy mechanizmy zapalenia typu 2 oraz zapalenia zależnego od wydzielania IL-1 beta (szkandarowej cytokiny prozapalnej) i proponuje model ich wzajemnego oddziaływania podczas rozwoju IgE-zależnej alergii pokarmowej u chorych na AZS. Ponadto, Autor przedstawia także teoretyczne podstawy potencjalnego przeciwzapalnego oddziaływania na procesy leżące u podstawy odpowiedzi alergiczno-zapalnej z wykorzystaniem antagonizmu IL-1 beta. Obydwa zaproponowane modele stanowią niezwykle ciekawą i inspirującą konkluzję omawianej publikacji.

Publikacja 3 zawiera wyniki badań metabolomicznych przeprowadzonych w podobnych grupach pacjentów. Celem badań stanowiących treść publikacji 3 była analiza i identyfikacja zmian w profilu wolnych aminokwasów u pacjentów pediatrycznych w wieku 0-5 lat z AZS oraz IgE-zależną alergią pokarmową, IgE-niezależną alergią pokarmową lub bez alergii pokarmowej. Uzasadnieniem dla tak sformułowanego celu badań była postulowana we wcześniejszych publikacjach potencjalna rola oznaczeń

metabolomicznych w przewidywaniu wystąpienia objawów klinicznych. Ponadto, Autor przyjął za cel próbę określenia ewentualnej roli wolnych aminokwasów w patogenezie alergii IgE-zależnej. Zidentyfikowano trzy aminokwasy - homocytrulinę (Hcit), sarkozynę (Sar) i L-tyrozynę (Tyr), których stężenia różniły się istotnie między badanymi grupami. W grupie z alergią IgE-niezależną istotnie obniżone były stężenia Hcit i Tyr, natomiast stężenie Sar było istotnie niższe w grupie chorych z alergią IgE-zależną. W moim odczuciu najbardziej interesujące i intrygujące są właśnie wyniki uzyskane w odniesieniu do tego ostatniego aminokwasu. W dyskusji wyników Autor dostarcza przekonującego i logicznego wytłumaczenia obniżenia poziomu Sar u chorych na IgE-zależną alergię pokarmową, powołując się na wyniki badań wskazujących na możliwą rolę aminokwasów w hamowaniu wiązania IgE z alergenami np. orzechów. Taki sposób dyskusji dowodzi naukowej dojrzałości Doktoranta i umiejętności logicznej interpretacji uzyskanych wyników w odniesieniu do uprzednio opublikowanych danych.

Publikacja 4 to wspomniana już wcześniej praca pogładowa. Przedstawia ona w sposób dogłębny podobieństwa i różnice w przebiegu alergii pokarmowej i parazytozy, patomechanizmy molekularne i szlaki metaboliczne towarzyszące rozwojowi alergii i infestacji pasożytniczej a także dostępne metody badawcze oraz kierunki prowadzonych badań naukowych, mających na celu wdrożenie precyzyjnych technik medycznych do diagnostyki różnicującej. Autor wskazuje w tej pracy przeglądowej na konieczność rozważenia - obok diagnostyki alergologicznej - także badań parazytologicznych u pacjentów z niespecyficznymi objawami nie pozwalającymi początkowo właściwie ukierunkować postępowanie diagnostyczne. Praca ta zwraca uwagę na istotne zagadnienie kliniczne i może stanowić źródło wskazówek i inspiracji zarówno w praktyce lekarskiej, jak i w planowaniu badań naukowych i klinicznych.

Na zakończenie pragnę przedstawić kilka uwag, które nie umniejszają ogólnej pozytywnej oceny przedstawionego cyklu publikacji.



- 1) Wstęp, jak wspomniałem, wprowadza umiejętnie w zagadnienia będące przedmiotem cyklu prac, jednak w niektórych miejscach (szczególnie w opisie klinicznych aspektów alergii) informacje podane są w sposób uproszczony, czasami nawet „publicystyczny”. Z jednej strony można z takiego sposobu podania wiadomości uczynić zarzut, jednak ze względu na zróżnicowaną tematykę cyklu prac, a tym samym zróżnicowany profil docelowego odbiorcy, takie wprowadzenie sprawia, że zagadnienia stają się czytelniejsze także dla Czytelnika w mniejszym stopniu zaznajomionego z klinicznymi zagadnieniami alergii.
- 2) Oznaczenia przeprowadzono w relatywnie małych grupach co mogło wpłynąć na istotność kliniczną. Ponadto, wyodrębnienie – w obrębie grupy z alergią IgE-niezależną – grupy z alergią opóźnioną jedynie na podstawie obserwacji objawów oraz z zastosowaniem otwartej próby prowokacyjnej, siłą rzeczy może obarczone być pewnym błędem wynikającym z subiektywnej oceny objawów, co mogło przyczynić się do niestwierdzenia istotności klinicznej między (małymi liczebnie, jak wspomniano) grupami w odniesieniu do większości cytokin profilu Th17. Badania w większych grupach z pewnością pozwolą uściślić interesujące obserwacje dotyczące tej grupy mediatorów.
- 3) W badaniu sensytyzacji pokarmowej IgE-zależnej stosowano test ALEX². Jest on w naszym kraju szerzej dostępny i korzystniejszy ekonomicznie, pozwala także na oznaczenie IgE swoistych dla znacznej liczby zarówno ekstraktów, jak i molekuł alergenowych. Warto jednak wspomnieć, że w wielu publikacjach dotyczących alergii IgE-zależnej pokarmowej w celu oznaczeń IgE dla komponentów alergenowych używa się testu ISAC uznawanego poniekąd za metodę referencyjną.

Przedstawiony mi do recenzji cykl prac składający się na rozprawę doktorską mgr. Kacpra Packiego oceniam bardzo wysoko.

Stanowi on nowatorskie rozwiązanie właściwe sformułowanego problemu naukowego z zastosowaniem właściwie dobranych metod badawczych oraz uzupełnione o spójną i logiczną dyskusję wyników. Przedstawione do oceny publikacje stanowią również świadectwo szerokiej wiedzy teoretycznej Doktoranta oraz potwierdzają, że potrafi On zaplanować i przeprowadzić badania naukowe.

Co więcej, Doktorant proponuje w swoich publikacjach zarówno modele wyjaśniające omówione wcześniej aspekty immunologiczne alergii IgE-zależnej, jak i oparty na wynikach własnych badań algorytm diagnostyczny stosowany w przypadku podejrzenia alergii pokarmowej u dzieci z AZS. Na podkreślenie zasługuje także wdrożeniowy charakter doktoratu mający praktyczne implikacje warte rozpropagowania w alergologicznej działalności lekarskiej.

W związku z powyższym potwierdzam, że praca doktorska mgr. Kacpra Packiego spełnia warunki zawarte w ustawie „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 i wnoszę do Wysokiej Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Kacpra Packiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na dużą wartość poznawczą i naukową oraz nowatorstwo pracy wnoszę o jej wyróżnienie.

Łódź, 15.02.2024



dr hab. n. med. Marcin Kurowski
prof. UM w Łodzi