

Recenzja pracy doktorskiej lek. med. Izabeli Sardeckiej - Milewskiej pt. „**Ocena wpływu wybranych dietetycznych czynników immunomodulujących na nabywanie tolerancji u dzieci z alergią na białka mleka krowiego do 2 roku życia**”.

Opinię wydano na podstawie uchwały Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz pisma Prodziekana ds. Nauki - prof. dr hab. n. med. Agnieszki Wierzbowskiej, z dn. 30. 09. 2019 r.

Choroby alergiczne stanowią aktualny i istotnie narastający problem zdrowotny populacji ludzkiej na całym świecie, notowany od ostatnich 4 dekad. Alergiczny problem zdrowotny dotyczy, w zróżnicowanie odsetku (30,0% do 40,0%), ludności zamieszkującej kraje o wysokim standardzie ekonomicznym, stopniu uprzemysłowienia i statusie higienicznym. Choroby alergiczne nie omijają populacji wieku rozwojowego, a częstość występowania pierwszej manifestacji klinicznej alergii, czyli alergii pokarmowej szacuje się w tych krajach na 6-8%. U niemowląt i małych dzieci (do 3 roku życia), alergii pokarmowa jest powiązana etiopatogenetycznie ze stanem nadwrażliwości organizmu na najczęściej spożywane pokarmy (źródło alergenów), jakim są białka: mleka krowiego, jaja kurzego, ziarna pszenicy, soi i inne. Alergię na białka mleka krowiego rozpoznaje się zarówno u niemowląt karmionych naturalnie (od 0,5-1,0%), jak i sztucznie lub w sposób mieszany, a częstość jej występowania ocenia się na 2-3% w pierwszych 3 latach życia.

Od co najmniej 20 - 30 lat, u pacjentów z alergią pokarmową (w tym z alergią na białka mleka krowiego), diagnozowanych i leczonych w różnych ośrodkach klinicznych świata, a także i w Polsce, dostrzega się cztery istotne problemy, związane z tą chorobą, czyli: wzrastający odsetek chorych o ciężkim przebiegu klinicznym; narastający odsetek chorych z przetrwałą alergią (głównie na białka mleka krowiego), związany z opóźnionym nabywaniem tolerancji immunologicznej na pierwotnie szkodliwy alergen pokarmowy; pogarszanie się, jakości życia chorujących dzieci i ich rodzin oraz wzrastające koszty leczenia tej grupy chorych.

Podejmowanie badań, nawiązujących do wymienionych problemów oraz próby ich wyjaśniania i rozwiązywania w wymiarze lokalnym i ogólnym, są bardzo uzasadnione.

Takie oczekiwania spełnia przesłana mi do oceny rozprawa doktorska autorstwa lek. med. Izabeli Sardeckiej-Milewskiej pt. „Ocena wpływu wybranych dietetycznych czynników immunomodulujących na nabywanie tolerancji u dzieci z alergią na białka mleka krowiego do 2 roku życia”. Promotorem rozprawy doktorskiej **jest** prof. dr hab. med. Aneta Krogulska, autorytet kliniczny i naukowy w zakresie problematyki alergii pokarmowej wieku rozwojowego w naszym kraju.

### **1. Ocena redakcyjna rozprawy doktorskiej.**

Przedłożony mi do oceny egzemplarz rozprawy doktorskiej odbiega od klasycznego redakcyjnego opracowania monograficznego. Rozprawa ta składa się, bowiem z cyklu 5 prac (2 poglądowych i 3 oryginalnych), opublikowanych w czasopiśmie medycznych o zasięgu międzynarodowym. W czterech pracach (I-IV), doktorantka jest pierwszym autorem, w piątej pracy (V) jest współautorem.

W układzie redakcyjnym rozprawa doktorska zawiera następujące podrozdziały:

1. Spis treści oraz Wykaz skrótów i symboli (str. 1-2).

2. Wykaz prac wchodzących w skład cyklu (str.3).

Wykaz zawiera nazwiska autorów, tytuły prac i nazwy czasopism (miejsce publikacji) oraz rok publikacji)

3. Wstęp (str. 4 - 10).

#### 4. Cele pracy (str.11).

#### 5. Omówienie wyników prac wchodzących w skład cyklu (str. 12 - 99).

Każdą z pięciu poszczególnych publikacji, zamieszczonych w formie kserokopii i wchodzących w skład rozprawy, poprzedza oddzielne omówienie wyników i odpowiedni komentarz, dokonany przez doktorantkę.

#### 6. Wnioski (str. 100).

Rozdział zawiera 11 wniosków, wyciągniętych przez doktorantkę na podstawie wyników badań zamieszczonych w poszczególnych publikacjach

#### 7. Streszczenie (str.103-100).

Rozdział zawiera streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim.

#### 8. Abstrakt (str.105-109).

Rozdział zawiera streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim.

#### 9. Piśmiennictwo. (str 109-115).

Rozdział zawiera wykaz 94 publikacji medycznych w języku angielskim i polskim, cytowanych przez autorkę we **Wstępie** rozprawy doktorskiej.

Ponadto, każda opublikowana praca zawiera wykaz piśmiennictwo, wykorzystanego przez autorów do przygotowania publikacji, stanowiących przedmiot dysertacji doktorskiej.

#### 10. Oświadczenia współautorów (str. 116 -125).

Współautorzy złożyli pisemne oświadczenia, zawarte w egzemplarzu rozprawy doktorskiej.

Oświadczenia zawierają informacje o udziale współautora w odpowiednim badaniu, wkładzie osobistym w przygotowaniu prac do druku, a także zgodę na wykorzystanie tych publikacji do redakcji niniejszej rozprawy doktorskiej.

#### 11. Spis publikacji naukowych oraz bibliometryczna ocena dorobku naukowego doktorantki (str. 126 - 129).

Wynosi ona w punktacji MNiSZW: 250 pkt. zbiorowo oraz 125 pkt. jako pierwszy autor.

Współczynnik międzynarodowego oddziaływania wynosi IF: 15.597 zbiorowo oraz 7.397 jako pierwszy autor. Indeks cytowań w skali Hirscha wynosi 1.

#### **Podsumowanie**

***Rozprawa doktorska lek. med. Izabeli Sardeckiej-Milewskiej pt. „Ocena wpływu wybranych dietetycznych czynników immunomodulujących na nabywanie tolerancji u dzieci z alergią na białka mleka krowiego do 2 roku życia” jest zredagowana poprawnie i zawiera wszelkie wymagane rozdziały, zamieszczane w tego typu rozprawach naukowych.***

## 2. Ocena merytoryczna pracy doktorskiej.

### Wstęp.

Doktorantka omawia aktualne problemy i trendy badawcze w światowej i polskiej alergologii, dokumentując swoje rozważania cytowaniem 94 pozycji piśmiennictwa.

Niektóre z tych problemów stały się przedmiotem badań doktorantki, a wyniki badań zostały zamieszczone w publikacjach tworzących niniejszą dysertację doktorską.

Wyniki badań, prowadzonych przez doktorantkę, zostały zawarte w 5 publikacjach (3 oryginalnych oraz 2 poglądowych), składających się na recenzowaną rozprawę doktorską.

Tematyka badawcza odpowiada na sformułowane przez doktorantkę **szczegółowe Cele Pracy**, zamieszczone na stronie 11 rozprawy.

W niniejszej recenzji zostały one omówione, jako osiągnięcia badawcze doktorantki, powiązane tematycznie z:

a) udziałem czynnika genetycznego oraz wybranych czynników okołoporodowych i środowiskowych (w tym także niektórych składników dietetycznych spożywanych przez

kobiety w ciąży) w rozwoju alergii na białka mleka krowiego (ABMK) oraz przebieg kliniczny choroby u dzieci do 2 roku życia;

**b)** badaniami nad procesem nabywania tolerancji u dzieci z alergią na białka mleka krowiego, z uwzględnieniem fenotypu choroby i wpływu wybranych immunomodulujących czynników dietetycznych na ekspresję FOXP3mRNA, markera nabywania tolerancji immunologicznej.

### **3. Charakterystyka uzyskanych wyników.**

**Ad a)** z tematem tym wiążą się publikacje oryginalne nr III. i V.

**Publikacja III. „Early risk factors for cow’s milk allergy in children in the first year of life” , zamieszczona w Allergy and Asthma Proceedings (2018r).**

Uzyskane wyniki wnoszą cenne wartości poznawcze dotyczące czynników ryzyka, odnoszonych do uwarunkowań i rozwoju alergii na białka mleka krowiego u 138 niemowląt, u których rozpoznanie choroby alergicznej ustalono na podstawie doustnej próby eliminacji i prowokacji mieszkanką mleczną. Grupę kontrolną stanowiło 101 niemowląt bez cech uczulenia i alergii. Narzędziem badawczym do uzyskania danych od rodziców/opiekunów prawnych badanych niemowląt był Kwestionariusz Ankiety. Wartość współczynnika ryzyka (OR) odzwierciedlała stopień oddziaływania badanego czynnika na rozwój ABMK w badanej grupie niemowląt.

**Analizując wpływ obciążeń rodzinnych na rozwój ABMK**, doktorantka potwierdziła znaczenie występowania chorób alergicznych w rodzinie. W porównaniu do grupy kontrolnej, ryzyko wystąpienia ABMK było **dwukrotnie większe**, jeśli choroba alergiczna występowała u rodzeństwa, a czterokrotnie wyższe, gdy w rodzinie występowały takie choroby jak: atopowe zapalenie skóry, czy astma.

W grupie dzieci z ABMK matki miały wyższe wykształcenie czterokrotnie częściej, a ojcowie dwukrotnie częściej, w porównaniu do rodziców niemowląt z grupy kontrolnej.

**Wśród badanych czynników okołoporodowych** - wcześniactwo oraz wiosenny sezon urodzenia dzieci, wiązały się z dwukrotnie częstszym występowaniem ABMK w badanej grupie niemowląt, w porównaniu do grupy kontrolnej. Inne badane czynniki osobnicze niemowlęcia, podobnie jak i poród poprzez cięcie cesarskie, nie znalazły powiązania z rozwojem ABMK.

**Rodzaj karmienia i długość karmienia należały do głównych czynników środowiskowych**, będących przedmiotem badania. Doktorantka ustaliła, że ryzyko rozwoju ABMK było czterokrotnie wyższe w grupie niemowląt karmionych sztucznie, w porównaniu do grupy niemowląt karmionej naturalnie.

Kontakt niemowląt ze zwierzętami domowymi zmniejszył trzykrotnie ryzyko rozwoju ABMK. Badanie powyższe nie wykazało wpływu **antybiotykoterapii** stosowanej w pierwszym półroczu życia dziecka, a także biernego narażenia na dym tytoniowy, zarówno w okresie życia płodowego (ciąża), jak i po urodzeniu (dom), na rozwój ABMK.

**Te wyniki odbiegają od zalecanych działań prewencyjnych, dotyczących rozwoju alergii (sic!).**

Badanie wykazało, że wpływ czynników okołoporodowych i środowiskowych na patomechanizm rozwoju ABMK, powodował czterokrotnie wyższą częstość występowania alergii IgE-zależnej niż IgE-niezależnej w badanej grupie 138 niemowląt z ABMK.

#### **Podsumowanie publikacji nr III.**

*Całokształt przeprowadzonych badań upoważnił doktorantkę do identyfikacji czterech czynników, które w największym stopniu wpływały na rozwój ABMK w badanej grupie dzieci.*

*Były to: pozytywny rodzinny wywiad alergiczny, wyższe wykształcenie matek chorych dzieci, długość karmienia naturalnego oraz obecność zwierząt w środowisku domowym (?).*

**Publikacja nr V. „The impact of immunomodulatory factors from maternal diet during pregnancy on cow's milk allergy in offspring - a pilot study in the pediatric population of the Kuyavian- Pomeranian Voivodship. Allergologia et Immunopathologia. 2019.**

Celem pracy badawczej doktorantki była ocena wpływu dietetycznych czynników, uznawanych za immunomodulujące, spożywanych przez kobiety w ciąży z woj. kujawsko-pomorskiego - na rozwój ABMK u ich potomstwa. **Metodykę przeprowadzenia tych badań, a także oryginalność hipotezy badawczej, należy uznać za pionierskie, bo to pierwsze tego typu badania przeprowadzone w Polsce. Do grupy badanej zakwalifikowano 51 par matka - niemowlę z ABMK. Grupę kontrolną stanowiło 25 par matka - zdrowe niemowlę w analogicznym wieku.** Wśród niemowląt chorych - 54,1% demonstrowało alergiczne zapalenie jelita grubego i/ lub odbytnicy; identyczny odsetek stanowiły niemowlęta z atopowym zapaleniem skóry; u 49,0% niemowląt z tej grupy występowały także zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego.

Dokonano analizy retrospektywnej diety, dotyczącej dziennego spożycia wybranych składników odżywczych przez kobiety ciężarne w III trymestrze ciąży, na podstawie siedmiodniowego jadłospisu matki oraz zwalidowanego kwestionariusza ankiety (Food Frequency Questionnaire). Określano zawartość poszczególnych składników w diecie; wyniki porównywano z normami Instytutu Żywności i Żywienia.

W obydwu grupach matek (dzieci z ABMK i grupie kontrolnej) oceniano: kaloryczność diety, spożycie białek, tłuszczów, węglowodanów, błonnika, Ca<sup>++</sup>; zawartość w diecie witamin: A, grupy B, C, E, folianów, wit. B12 oraz LC-PUFA; spożycie witaminy D przez matki; określił także czas kontaktu kobiety ciężarnej z produktami mlecznymi.

**Podsumowanie publikacji nr V.**

*W badaniu powyższym doktorantka wykazała, że w I trymestrze ciąży 60,8 % matek dzieci z ABMK spożywało mleko krowie i produkty mleczne; w grupie kontrolnej odsetek ten dotyczył 68,0% matek dzieci zdrowych. Analiza diet kobiet ciężarnych dzieci z ABMK wykazała, że spożywały one w ciąży istotnie mniej wit. D, LC-PUFA i retinolu oraz istotnie więcej β-karotenu i folianów, niż matki dzieci zdrowych. Nie wykazano istotnych różnic jakościowych i ilościowych w spożywaniu innych badanych składników pokarmowych w III trymestrze ciąży przez matki z obydwu badanych grup.*

**Ad. b)** tematyka dotyczy nabywania tolerancji w ABMK (praca oryginalna nr IV i prace poglądowe nr I i II).

**Publikacja nr I.**

**Tolerancja doustna - czynniki prognostyczne, patomechanizm, czynniki immunomodulujące. Alergia Astma Immunologia . 2015.**

Praca ma charakter poglądowy. Doktorantka omówiła w niej aktualne poglądy i wiedzę, dotyczącą pojęcia tolerancji immunologicznej oraz istotnych czynników, odgrywających rolę w procesie nabywania tolerancji w alergii pokarmowej. Scharakteryzowała szczegółowo rolę limfocytów Treg, limfocytów B oraz systemu GALT i jego składowej - nabłonka jelitowego, jako bariery mechanicznej i immunologicznej . Omówiła także udział różnych czynników (prognostycznych, immunomodulujących), którym przypisuje się wpływ na patomechanizmy związane z nabywaniem tolerancji tj. predyspozycja genetyczna, rodzaj diety, w tym karmienia naturalnego, sztucznego - kształtujących skład mikrobiomu jelitowego, wiek chorego, rodzaj i dawkę szkodliwego alergenu, rolę probiotyków / prebiotyków, witamin (w tym C i D), antyoksydantów i innych.

#### **Publikacja nr II.**

##### **The influence of dietary immunomodulatory factors on development of food allergy in children. Adv Dermatol Allergol. 2017.**

Jest to praca poglądowa, omawiająca udział wybranych czynników środowiskowych oraz dietetycznych, którym przypisuje się wpływ na ekspresję genów, poprzez oddziaływanie epigenetyczne, które prowadzi m.in. do trwałych zmian w odpowiedzi immunologicznej populacji ludzkiej. Zmiany te skutkują wzrostem częstości występowania chorób alergicznych i autoimmunologicznych. W dalszej części pracy autorka omawia szczegółowo rolę czynników immunomodulujących, w tym diety, probiotyków, antyoksydantów, wit. D, nienasyconych i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, oddziałujących m.in. na mikrobiom jelitowy. Praca rozszerza aktualną wiedzę na temat potencjalnej roli i skuteczności tych czynników, a także ich zastosowania w działaniach zapobiegających rozwojowi chorób alergicznych i autoimmunologicznych.

Obydwie publikacje poglądowe są dowodem bardzo dobrego przygotowania teoretycznego doktorantki do pracy badawczej, co znalazło odzwierciedlenie w recenzowanych oryginalnych pracach Jej autorstwa.

#### **Publikacja nr IV.**

##### **FOXP3 expression, wit. D, and C in the prediction of tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy. J Investig Allergol Clin Immunol. 2020.**

Jest to praca oryginalna, w której badaniem prospektywnym objęto tę samą grupę 138 dzieci z ABMK i 101 zdrowych niemowląt (grupa kontrolna), w której oceniano czynniki rozwoju alergii na białka mleka krowiego (opisaną wcześniej w publikacji nr III). W chwili zakwalifikowania do badań dzieciom z obu grup pobierano krew, w celu oznaczenia: asIgE, stężenia witamin C i D oraz ekspresji FOXP3mRNA (I etap badań). Po 6 miesiącach od pierwszego etapu, oceniano u dzieci z ABMK proces nabywania tolerancji na białka mleka krowiego, stosując doustną próbę prowokacyjną z produktami mlecznymi poddanymi wysokiej temperaturze (II etap badań). Wynik ujemny próby prowokacji, świadczący wstępnie o nabytej tolerancji, weryfikowano doustną próbą prowokacyjną z mlekiem surowym. W ten sposób zidentyfikowano „fenotyp przetrwałej alergii na białka mleka krowiego” u 54 (39,1% chorych). Spośród pozostałych 84 dzieci (60,9% ) tolerujących produkty mleczne poddane obróbce termicznej, nadal tolerowało te produkty 43 (31,2%), prezentując fenotyp „częściowej tolerancji”, a 41 dzieci (29,7%) wykazało całkowitą tolerancję na produkty mleczne przetworzone termicznie i produkty surowe, czyli fenotyp „pacjentów wyrosłych z alergii na białka mleka krowiego”.

#### **Podsumowanie publikacji nr IV.**

*Średnia wartość ekspresji FOXP3 na komórkach jądrowych krwi w grupie dzieci z ABMK była statystycznie znamienne niższa (2,07+-1.23), niż w grupie zdrowych dzieci (2,98+-1,52). Statystycznie znamienne wyższa była także ekspresja FOXP3 u dzieci z IgE-niezależną ABMK (2,25), w porównaniu do IgE-zależnej ABMK (1,79).*

*Wykazano zależność poziomu ekspresji FOXP3mRNA od fenotypu ABMK i tolerancji doustnej białek mleka krowiego. Według doktorantki, u dzieci z poziomem FOXP3mRNA < 1,45 z dużym prawdopodobieństwem należy podejrzewać występowanie fenotypu „przetrwałej ABMK”; prawdopodobnie dzieci te nie nabędą tolerancji do 2 roku życia.*

*Nie stwierdzono istotnego związku między ekspresją FOXP3 mRNA a poziomem surowiczym witamin C i D, zarówno w grupie chorych z ABMK, jak i kontrolnej.*

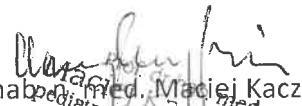
### 3. Wnioski.

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorantka wyciągnęła 11 wniosków, które są powtórzeniem niektórych szczegółowych wyników realizowanej tematyki badawczej. W opinii recenzenta - wnioski powinny być uogólnieniem zagadnień Celu badawczego i powinny odzwierciedlać trend (korzystny, niekorzystny) badanego zjawiska lub czynnika, w odniesieniu do istoty choroby. Wydaje się, że niektóre z wniosków szczegółowych można tematycznie połączyć we wnioski ogólne.

### Podsumowanie końcowe.

Publikacje wchodzące w skład niniejszej dysertacji naukowej, zawierające oryginalne wyniki badań doktorantki, a także prace pogładowe Jej autorstwa, zostały zamieszczone w międzynarodowych czasopismach medycznych. Wyniki tych badań wnoszą cenne naukowe wartości poznawcze, dotyczące czynników ryzyka rozwoju alergii na białka mleka krowiego: genetycznych i epigenetycznych (okołoporodowych, osobniczych i dietetycznych) u dzieci w najmłodszym wieku. Wyniki badań prowadzonych przez doktorantkę nad procesem nabywania tolerancji przez dzieci z ABMK, dostarczają nowych, oryginalnych informacji, wskazujących na zależność nabywania tolerancji od fenotypu choroby. Możliwość jednoczesnego monitorowania procesów immunologicznych, dotyczących tolerancji poprzez ocenę ekspresji biomarkera FOXP3mRNA w u badanych dzieci z ABMK należy również zaliczyć do oryginalnych osiągnięć badawczych doktorantki. Pierwsze autorstwo doktorantki w czterech, współautorstwo w piątej z opublikowanych prac, składających się na niniejszą rozprawę doktorską, a także dotychczasowy dorobek naukowy, upoważniają recenzenta do uznania tej rozprawy za spełniającą również wymogi do wyróżnienia naukowego. Przedkładam wniosek Komisji Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. med. Izabeli Sardeckiej-Milewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, 29. 11. 2019

  
Prof. dr hab. Maciej Kaczmarek  
pediatra alergol. g. gastrolog  
0625 17