

Oponentský posudek

disertační práce RNDr. Petra Šotkovského

POTRAVINOVÁ ALERGIE NA PROTEINY PŠENIČNÉ MOUKY

Potravinová alergie je vysoce aktuálním tématem současné medicíny, a je proto tématem intenzivního experimentálního i klinického výzkumu. Současně jsou velmi moderními tématy i problematika diagnostiky pomocí alergenových složek a molekulární alergologie obecně. Tyto pohledy otevírají zcela nové perspektivy diagnostiky alergických stavů. Z těchto důvodů považují téma disertační práce za velmi dobře zvolené.

Disertační práce o rozsahu 63 stran textu (včetně obrázků, tabulek a literatury) je doplněna třemi vlastními originálními pracemi, které se týkají jednotlivých cílů práce.

První část práce se zabývá postupně obecnými otázkami potravinové alergie, alergie na pšeničnou mouku, její diagnostiky a otázkami alergenových složek v kontextu této alergie. Dalším bodem je problematika změny alergenicity způsobené tepelným zpracováním potravin studovaná na myším modelu.

Druhá část práce je věnována prezentaci vlastních výsledků – zejména tedy výsledkům identifikace pšeničných proteinů vázících IgE alergických pacientů a dále jejich izolaci a purifikaci. Následně byla u těchto proteinů ověřována jejich reaktivita s IgE alergických pacientů pomocí ELISA testu a testu aktivace bazofilů. Tato část je také doplněna výsledky z oblasti myšího modelu potravinové alergie.

Ke každému z těchto oddílů je připojena příslušná vlastní publikovaná práce. Dva z těchto článků se týkají problematiky izolace a charakterizace pšeničných alergenů, tyto články byly publikovány ve kvalitních impaktovaných časopisech a Dr. Šotkovský je u obou prvním autorem. Třetí článek se týká změn alergenicity ovalbuminu po tepelném zpracování, článek byl publikován v open-access zdroji a Dr. Šotkovský je uveden jako spoluautor. Text je doplněn odkazy na 11 autorových vlastních konferenčních abstraktů a 4 abstrakta, kde je Dr. Šotkovský spoluautorem. Jsou uvedeny i reference na 2 ústní prezentace na mezinárodních fórech. Všechny tyto práce se vztahují k danému tématu. Dále je na 10 stranách uveden široký přehled relevantní literatury, odkazy nejsou však zapracovány do vlastního textu.

Způsob zpracování disertační práce je originální a podává ucelený pohled na řešenou problematiku.

Deklarované cíle práce:

- 1) Pomocí proteomických technik identifikovat pšeničné proteiny nejčastěji rozpoznávané IgE protilátkami pacientů.
- 2) Vyvinout metody pro izolaci a purifikaci těchto proteinů v množstvích, která by umožňovala následné strukturální a funkční analýzy.
- 3) Zkoumat klinickou relevanci nově identifikovaných a purifikovaných alergenů pomocí stanovení spec. IgE a kožních testů.
- 4) Testovat aktivaci patientských bazofilů po expozici těmto alergenům.
- 5) Analyzovat efekt pepsinu na imunogenicitu extrahovaných pšeničných proteinů.
- 6) Na myším modelu zkoumat vliv tepelného zpracování ovalbuminu na jeho alergenicitu.

Zvolené metody:

Metody byly zvoleny adekvátně deklarovaným cílům. K určitým drobným nejasnostem se vracím níže v otázkách pro autora. Literárně známé práce týkající se alergie na pšenici obvykle pracují s pacienty s tzv. pekařským astmatem. Zde autor zvolil pacienty s diagnózou atopického ekzému, což vidím pozitivně jako určitou výzvu. Nicméně u ekzému bývá někdy poměrně obtížné zhodnotit klinickou relevanci detekované senzibilizace v případě, že nebyl proveden provokační test danou potravinou. Pro detekci složek vážících IgE (cíl 1) není tato případná diskrepance mezi asymptomatickou senzibilizací a klinicky relevantní alergií podstatná, a neovlivňuje tedy získané výsledky. Přesto bych viděl jako vhodné tyto dva termíny důsledněji rozlišovat. Určité zkreslení ale může nastat v oblasti vyhodnocování klinické relevance nově identifikovaných a purifikovaných alergenů (cíl 3). Je třeba zdůraznit, že všechny použité metody (spec. IgE, kožní testy a test aktivace bazofilů) detekují primárně pouze IgE senzibilizaci k danému alergenu, nikoli ale přítomnost klinicky relevantní alergie, kterou je vždy potřeba posuzovat v kontextu reálné reaktivity pacienta na daný alergen, případně v kontextu provokačního testu. Otázkou by mohl být i použitý cut-off pro pozitivitu spec. IgE, který je stanoven na 0,35 IU/ml, nicméně řada prací ukazuje, že vyšší pravděpodobnost přítomnosti klinicky významné alergie na složky pšeničné mouky je asociována až s hodnotami spec. IgE řádově vyššími.

Obecně lze nepochybně říci, že použité metodiky jsou zcela adekvátní stanoveným cílům a jejich úroveň je velmi vysoká. Forma zpracování je bezvadná a odráží jistě dlouhodobé a bohaté zkušenosti pracoviště autora s experimentální výzkumnou činností.

Výsledky:

Odpovědi na výše uvedené otázky jsou v disertační práci dostatečně přehledně prezentovány formou stručných souhrnů a příložením příslušných vlastních originálních publikací, kde je možno se podrobněji seznámit s danou problematikou včetně použitých metodik, statistických hodnocení, grafů, tabulek, obrázků, diskusí, závěrů a konkrétně odkazované literatury.

Hlavním výsledkem první studie je identifikace nových alergenových komponent pšenice z různých pšeničných kultivarů ověřením jejich reaktivity s patientskými IgE protilátkami. Bylo identifikováno celkem 19 proteinů o molekulové hmotnosti od 10 do 100 kDa. Po jejich izolaci byl testován vliv pepsinu a 4 složky byly identifikovány jako pepsin-rezistentní. Dále byla testována reaktivita vlastního pšeničného extraktu a složek (inhibitorů alfa-amylázy 1 a 3) s patientskými a kontrolními séry pomocí vyvinutého ELISA testu. Byl potvrzen významný rozdíl v reaktivitě mezi patientskými a kontrolními séry. Reaktivita patientských bazofilů na vlastní extrakt byla potvrzena i testem aktivace bazofilů, reaktivita na inhibitory alfa-amylázy 1 a 3 byla pozorována jen u poloviny pacientů, ve druhém případě pozorována nebyla, což naznačuje nejspíše alergii na jiné složky u daných pacientů. Vzhledem k nízkému počtu pacientů (6) nelze v tomto bodě vyvozovat ale žádný exaktní závěr.

Výsledkem druhé studie je izolace a purifikace složek pšenice v jejich nativní formě. Pro tuto izolaci a purifikaci v dostatečném množství byla vyvinuta nová metodika, která umožnila provést následné strukturní a funkční analýzy. Bylo izolováno celkem 27 složek, u 17 z nich byla testována IgE reaktivita a byl detekován různý stupeň reaktivity s patientskými IgE protilátkami (nejvyšší opět u některých známých inhibitorů alfa-amylázy, ale také u některých nově identifikovaných složek). IgE reaktivita sér pacientů s jinou než pšeničnou alergií byla slabá, reaktivita sér zdravých dárců byla nulová.

Získané množství jednotlivých složek umožňuje jejich užití v diagnostických metodikách a případnou produkci rekombinantní cestou.

Výsledkem třetí studie je průkaz, že ireverzibilní změny vzniklé v sekundární struktuře ovalbuminu po tepelném zpracování významně ovlivňují jeho zpracování trávicími enzymy a snižují jeho alergenicitu na myším modelu.

Význam práce:

Význam práce spočívá v prezentaci nových poznatků o alergenicitě složek pšeničné mouky, která úzce souvisí s otázkami klinické alergie na pšenici. Tyto nové poznatky mají potenciál zlepšit a zpřesnit diagnostiku alergie na pšeničnou mouku a v důsledku mít tedy i pozitivní dopad na péči o takto alergické pacienty.

Práce jednoznačně splňuje avizované cíle.

Formální stránka dizertační práce je velmi dobrá, jazyková úroveň a srozumitelnost je na vysoké úrovni. Celková grafická úprava spisu je kvalitní, s přehledným členěním jednotlivých částí. Drobným formálním nedostatkem je neuvedení odkazů na literaturu ve vlastním textu, nicméně vzhledem k tomu, že jsou přiloženy vlastní publikované články s odkazovanou literaturou, je tento nedostatek zcela nevýznamný.

K odbornému obsahu práce nemám kritických připomínek. Přesto, že jsem si vědom, že oblast klinické problematiky potravinové alergie není jistě autorovým primárním ohniskem zájmu, dovoluji si formulovat na závěr několik otázek týkajících se spíše této problematiky.

Otázky:

- 1) Vzhledem k tomu, že v rámci cílů práce je zmíněno i zkoumání klinické relevance jednotlivých složek, nebylo by dle mého názoru optimální vycházet pouze z přítomnosti IgE protilátek proti pšenici v séru pacientů. Má autor k dispozici údaje o přítomnosti klinicky významné alergie na pšenici u pacientů, jejichž séra byla použita? Jedná se o údaje anamnestické? Nebo byly prováděny i expoziční testy?
- 2) Může autor popsat a vysvětlit podrobněji metodiku použitého testu aktivace bazofilů? Dle stručně popsané metodiky byla detekována současná exprese obou aktivačních znaků (CD203c, CD63). Má tento postup nějaké přednosti oproti detekci exprese pouze jednoho z těchto znaků, což bývá někdy užíváno?
- 3) Jaký je názor autora na skutečnost, že patientské bazofily nebyly aktivovány inhibitory alfa-amylázy typu 3. Navíc reaktivita patientských IgE v ELISA testu s těmito složkami byla také výrazně slabší. Naznačuje to dle autora pravděpodobný rozdíl v klinické významnosti těchto složek? Byla/bude tato otázka dále řešena?

Závěr posudku

Po prostudování disertační práce jsem dospěl k závěru, že předložená práce má velmi vysokou odbornou úroveň a je svým obsahem aktuální a originální. Prezentované studie jsou účelně koncipovány a vědecky cílevědomě zpracovány. Autor v nich plně prokazuje svoji odbornou zralost a způsobilost ve vědecké práci.

Jednoznačně proto doporučuji práci k obhajobě a na jejím základě doporučuji, aby byl RNDr. Petru Šotkovskému udělen titul PhD.

V Plzni dne 14. 3. 2013

Doc. MUDr. Petr Panzner, CSc.