

## OCENA

### rozprawy doktorskiej mgr Piotra Szpakowskiego pt: **"Fenotyp komórki dendrytycznej w indukowanej prątkami *M. bovis* BCG synapsie immunologicznej z limfocytami w środowisku interleukiny 18"**.

Gruźlica mimo stosowanych leków i szeroko pojętej profilaktyki nadal jest poważnym problemem społecznym i zdrowotnym nie tylko w krajach trzeciego świata, ale także w państwach wysoko rozwiniętych, w tym w Polsce. Obecnie, na świecie, każdego roku 1,5 miliona osób umiera na gruźlicę, a 9 milionów ulega zakażeniu. Chociaż w większości przypadków antybiotykoterapia powoduje skuteczną eradykację drobnoustrojów z organizmu gospodarza, u pewnego odsetka jest nieskuteczna, co prowadzi do rozwoju gruźlicy i rozprzestrzenianiem się zakażenia. Dlatego też uwaga badaczy na całym świecie z jednej strony zogniskowana jest na poszukiwanie nowych tarcz terapeutycznych i nowych leków przeciwgruźliczych, z drugiej strony coraz częściej podkreśla się, że lepszą strategią do walki z chorobą jest jej zapobieganie niż leczenie. W tym nurcie badania dotyczą szczepionek, które skutecznie chroniły by przed zakażeniem i/lub zapobiegały rozwojowi czynnej postaci gruźlicy u osób już zakażonych. Jak dotąd, jedyną powszechnie dostępną szczepionką jest wyselekcjonowany szczep *Mycobacterium bovis* BCG. Jednakże jej skuteczność szczególnie wśród dorosłych, narażonych na zakażenie, jest ograniczona. Niektóre źródła podają, że jedynie 50 % osób zaszczepionych w dzieciństwie jest skutecznie chroniona przed zakażeniem i rozwojem czynnej postaci gruźlicy. Uważa się, że zanik lub osłabienie pamięci immunologicznej w wieku dojrzewania jest główną przyczyną zapadalności na gruźlicę i rozwoju jej czynnej postaci u dorosłych.

Mimo 2 dekad intensywnych badań, w wielu ośrodkach na świecie, nad odpowiedzią przeciwprątkową organizmu człowieka wiele pytań nadal pozostaje bez odpowiedzi. Makrofagi, komórki dendrytyczne i neutrofile są pierwszymi komórkami układu odpornościowego stykającymi się z prątkami gruźlicy po ich wnikięciu do płuc. W rozwój wtórnej odpowiedzi komórkowej zaangażowanych jest również szereg komórek odpornościowych wśród których limfocyty Th1 CD4<sup>+</sup> są najlepiej poznane. Limfocyty te

rozpoznają antygeny prątków gruźlicy prezentowane przez komórki dendrytyczne i makrofagi. To właśnie komórki dendrytyczne wydają się być kluczowe w aktywacji limfocytów Th1 do produkcji interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) nasilającej bakteriobójczą aktywność fagocytów.

Światowe badania nad nowymi szczepionkami przeciwgruźliczymi koncentrują się nad dwoma głównymi nurtami. Pierwszy dotyczy opracowania genetycznie modyfikowanych szczepów BCG, które były by bardziej immunogenne i dłużej warunkowały by ochronę organizmu gospodarza przed zakażeniem, szczególnie szczepami wysoko wirulentnymi. Drugi nurt dotyczy wprowadzania do bakterii BCG genów, których produkty docelowo oddziaływały by na aktywność komórek odpornościowych gospodarza, np. indukowały dojrzewanie fagosomów w makrofagach. Oczywiście nie wykluczone są kombinacje obu tych strategii.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska z jednej strony mieści się w nurcie badań nad nowymi szczepionkami przeciwgruźliczymi, z drugiej strony jest szczegółową analizą aktywności funkcjonalnej komórek dendrytycznych i ich oddziaływania na limfocyty T, w obecności antygenów prątkowych. Wiadomo, że lepsze poznanie odpowiedzi komórek gospodarza na zakażenie prątkami gruźlicy stanowi nieoceniony krok w kierunku skuteczniejszej walki z chorobą. Dlatego też wybór tematu przez Doktoranta uważam za trafny i zasługujący na uwagę. Niewątpliwą zaletą rozprawy jest bardzo aktualny temat badań mieszczący się w światowym nurcie.

W swoich badaniach Autor zastosował zmodyfikowany genetycznie szczep *M. bovis* BCG, produkujący ludzką interleukinę (IL) 18 oraz niezmieniony genetycznie, macierzysty szczep BCG. Wiadomo że, IL-18 działając synergistycznie z IL-12 indukuje produkcję IFN- $\gamma$  przez limfocyty Th1, aktywuje również komórki NK. Dlatego też cytokina ta odgrywa ważną rolę w odpowiedzi organizmu człowieka na zakażenie patogenami wewnątrzkomórkowymi. Można zatem założyć, że IL-18 będzie nasilać naturalną zdolność bakterii BCG do indukowania odpowiedzi typu Th1.

W swojej pracy Doktorant przeprowadził kompleksową ocenę zdolności antygenów prątkowych w tym szczepu BCG, rekombinowanego szczepu BCG produkującego IL-18 oraz antygeny PPD na te cechy komórek dendrytycznych, które warunkują tworzenie synapsy immunologicznej z limfocytami T, jak również na aktywność regulatorową komórek dendrytycznych wynikającą z produkowanych przez nie cytokin. Ponadto doktorant ocenił zdolność, pobudzanych w/w antygenami prątkowymi, komórek dendrytycznych do aktywacji limfocytów T na podstawie uwalniania przez te komórki IFN- $\gamma$  i IL-10. Wybór zagadnień i

zadań przedstawionych w tezach rozprawy uważam za bardzo interesujący i aktualny. Materiałem do badań była krew ludzka obwodowa pobierana od grupy ochotników, którzy w dzieciństwie byli szczepieni przeciw gruźlicy według obowiązującego w Polsce kalendarzyka szczepień. U osób tych przeprowadzono test tuberkulinowy i przy interpretacji wyników badań brano pod uwagę czy były tuberkulino dodatnie czy ujemnie. Taka analiza wzbogaciła uzyskane dane i rzuciła nowe światło na aktywność komórek immunologicznie kompetentnych osób dorosłych z dodatnim lub ujemnym odczynem tuberkulinowym.

Rozprawa doktorska mgr Piotra Szpakowskiego przygotowana została w postaci monografii o tradycyjnym układzie tekstu. Tekst rozprawy liczy 94 strony i został podzielony na 8 rozdziałów. We wstępie, Autor dokonał przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat komórek dendrytycznych i ich interakcji z limfocytami T. Szeroko scharakteryzował komórki dendrytyczne niedojrzałe i dojrzałe ze szczególnym uwzględnieniem produkowanych przez nie cytokin, ważnych w aktywacji limfocytów T. Dużo uwagi Doktorant poświęcił na oddziaływanie komórek dendrytycznych na limfocyty T w synapsie immunologicznej. W dalszej części wstępu, Autor omówił również rozpoznanie i internalizację antygenów mykobakterii przez komórki dendrytyczne. Informacje zawarte we wstępie są przedstawione syntetycznie, lecz wystarczająco aby zapoznać się z istotnością interakcji komórka-dendrytyczna-*Mycobacterium*-limfocyt T. Recenzentowi zabrakło jednak informacji na temat IL-18 i jej udziału w odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie, co niewątpliwie pomogło by w śledzeniu i analizie wyników, które dotyczą odpowiedzi komórek dendrytycznych i limfocytów na rekombinowany szczep BCG produkujący tą cytokinę. Doktorant nie ustrzegł się też od pewnych błędów redakcyjnych. Część skrótów jest wyjaśniana nie w momencie, w którym zostały użyte po raz pierwszy, niektóre skróty np. Akt1 (str.10) nie mają wyjaśnienia ani w tekście ani w wykazie skrótów. Ponadto Autor nie uniknął kalki z języka angielskiego np. cyrkulujące komórki dendrytyczne.

Cel pracy został jasno sformułowany i wynika z przedstawionych we wstępie głównych zagadnień dotyczących interakcji komórek dendrytycznych z limfocytami T, w kontekście prezentacji antygenów prątków gruźlicy. Moim zdaniem zabrakło w nim przesłanek dlaczego w badaniach zastosowano rekombinowany, produkujący IL-18, szczep BCG.

W następnym rozdziale Doktorant omówił zastosowane metody i sposoby oceny przeprowadzonych doświadczeń, które uważam za trafne i w pełni pozwalające na realizację celów pracy. Należy podkreślić bardzo dobre opanowanie przez mgr Szpakowskiego metody cytometrii przepływowej i hodowli komórek dendrytycznych. Metody zostały opisane

syntetycznie, ale opis ten daje możliwość późniejszego śledzenia otrzymanych wyników. Jednakże, w rozdziale tym Doktorant nie uniknął pewnych błędów redakcyjnych, np. czas inkubacji komórek podawany w godzinach oznaczany jest jako godzina lub skrótem z j. angielskiego „h”. Firmy Bio-Rad czy Becton-Dickinson nie są firmami polskimi, mimo, że mają przedstawicielstwa w naszym kraju. Recenzentowi zabrakło również sprecyzowania liczby bakterii dodawanych do komórek dendrytycznych gdyż liczbę komórek podawano na ml, a bakterii na studzienkę. Przypuszczam, że stosunek ten był 1:1. Uważam również, że Ryc. 7 przedstawiająca morfologię komórek dendrytycznych ocenianą przy zastosowaniu mikroskopu powinna się znaleźć w sekcji wyniki, gdzie Doktorant szczegółowo opisuje zmiany fenotypowe tych komórek pod wpływem antygenów prątkowych. Mimo tych uchybień redakcyjnych chciałabym jeszcze raz podkreślić trafny dobór metod badawczych do postawionych celów pracy.

Wyniki przeprowadzonych badań zilustrowano licznymi wykresami i podzielono na ułatwiające czytanie podrozdziały. Opracowanie wyników jest przejrzyste mimo, iż mnogość grup badawczych i możliwość licznych kombinacji między nimi wymagała dużego wkładu pracy w ich zredagowanie. Chciałabym również podkreślić dobrą analizę statystyczną, co ułatwiło interpretację uzyskanych wyników.

W pierwszym etapie badań Doktorant przeanalizował wpływ antygenów mykobakterii na ekspresję receptorów powierzchniowych komórek dendrytycznych ważnych w dojrzewaniu tych komórek i tworzeniu synapsy immunologicznej z limfocytami T oraz na produkcję cytokin i chemokin stanowiących tzw. III sygnał aktywacji limfocytów T. Analiza statystyczna wykazała istotne nasilenie ekspresji cząsteczki CD86 na komórkach dendrytycznych aktywowanych obu badanymi szczepami BCG. Natomiast wzrost ekspresji CD80 obserwowano jedynie w obecności bakterii BCG produkującej IL-18. Żywe prątki gruźlicy obu szczepów wzmagały uwalnianie IL-23 i IL-10, przy czym szczep produkujący IL-18 wykazywał znamienne silniejsze działanie. Ponadto, jedynie szczep rekombinowany nasilał uwalnianie chemotaktycznej chemokiny CXCL10 przez komórki dendrytyczne. Chociaż w interpretacji wyników należy wziąć pod uwagę wielorakie oddziaływanie wymienionych cytokin na komórki immunologicznie kompetentne, ważnym wydaje się nowatorskie spostrzeżenie Doktoranta, że obecność egzogennej IL-18 jest istotna w skutecznej aktywacji komórek dendrytycznych i usprawnia prezentację antygenów prątkowych.

W drugiej części pracy badawczej mgr Szpakowski oceniał wpływ komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami mykobakterii na zdolność limfocytów do

uwalniania IFN- $\gamma$  i IL-10. Doktorant wykazał, że szczep BCG produkujący IL-18 w mniejszym stopniu niż szczep macierzysty indukował uwalnianie obu cytokin przez limfocyty. To ważne spostrzeżenie może przemawiać na korzyść obecności endogennej IL-18, która częściowo hamuje odpowiedź typu Th2. Chociaż przedstawione wyniki są zinterpretowane prawidłowo, korzystne było by moim zdaniem uwzględnienie ilości IL-10 uwalnianej przez same komórki dendrytyczne i same limfocyty. Mimo, iż w hodowlach mieszanych liczba komórek dendrytycznych była 10-krotnie niższa niż w hodowlach samych komórek to zważywszy na nadprodukcję tej cytokiny przez komórki dendrytyczne stymulowane żywymi prątkami BCG należy uwzględnić ilość uwalnianej IL-10 przez te komórki. Tym bardziej, że jak wynika z opisu metody po 24-godzinnej inkubacji komórek dendrytycznych z BCG, bakterie nie były odpłukiwane i w hodowlach z limfocytami stymulowały komórki dendrytyczne. Być może tego typu analizy zostały przeprowadzone przez Doktoranta, zabrakło ich jednak w opisanych w rozprawie wynikach.

W kolejnym etapie badań Doktorant ocenił odsetek limfocytów wykazujących obecność wewnątrzkomórkowego IFN- $\gamma$  z uwzględnieniem fenotypu komórek. Bardzo interesujące wyniki wskazują, że komórki dendrytyczne pulsowane, tylko rekombinowanym szczepem BCG, w sposób niezmienny i równomierny aktywują limfocyty CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> oraz komórki NK CD56<sup>+</sup> do produkcji wewnątrzkomórkowego IFN- $\gamma$ . To ważne spostrzeżenie po raz kolejny przemawia na korzyść szczepu BCG produkującego IL-18. Recenzenta jednak zdziwiło dlaczego dwie ryciny obrazujące wyniki z wewnątrzkomórkowym IFN- $\gamma$  znalazły się bez opisu w dyskusji.

Syntetyczna dyskusja podobnie jak i wstęp świadczą o biegłej znajomości zagadnień dotyczących udziału komórek dendrytycznych w odpowiedzi organizmu gospodarza na zakażenie prątkami gruźlicy. Autor w sposób krytyczny dokonał przejrzystej analizy i interpretacji wyników na tle piśmiennictwa z ostatnich lat. Omówienie wyników własnych jest przeprowadzone w sposób rzeczowy. Celne są próby wytłumaczenia mechanizmów obserwowanych zjawisk. Rozprawę kończą wnioski wynikające z opisanych wyników.

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska stanowi bardzo cenny wkład w wiedzę dotyczącą odpowiedzi komórek dendrytycznych i limfocytów T na antygeny prątków gruźlicy. Opisane przez Doktoranta nowatorskie badania jasno sugerują, że rekombinowany szczep BCG, produkujący IL-18 można rozpatrywać jako potencjalną szczepionkę przeciwgruźliczą. Oddając swój głos w dyskusji chciałabym zaproponować włączenie do badań komórek pamięci. Rozprawę doktorską mgr Piotra Szpakowskiego oceniam pozytywnie. Uważam, że opisane wyniki

badania mają bardzo dużą wartość poznawczą i praktyczną. Dostarczają one nowych danych pozwalających na zrozumienie mechanizmów odpowiedzi przeciwprątkowej. Warto jeszcze raz podkreślić duży wkład Doktoranta w pracę eksperymentalną. Moim jedynym zastrzeżeniem są liczne błędy redakcyjne, które oczywiście nie pomniejszają wartości wykonanej przez Doktoranta pracy badawczej rzucają jednak pewien cień na ogólny wizerunek rozprawy.

Stwierdzam, że recenzowana przeze mnie praca doktorska w pełni spełnia wymogi ustawy o stopniach i tytułach naukowych. Dlatego też z pełnym przekonaniem wnoszę wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Piotra Szpakowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Magdalena Klink, prof. IBM PAN