



UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
INSTYTUT MIKROBIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

Zakład Wirusologii i Immunologii

Akademicka 19, 20-033 Lublin, fax: (4881) 537 59 59; tel: (4881) 537 59 43

Prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska
Zakład Wirusologii i Immunologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii UMCS

Lublin 29.12.2014

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr Marcina Włodarczyka

pt.: „Profil odpowiedzi cytokinowej na antygeny mykobakterii oraz ekspresja receptorów przekazywania sygnałów w aktywnej gruźlicy i latentnym zakażeniu *Mycobacterium tuberculosis*”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierownictwem naukowym Pani Profesor dr hab. Wiesławy Rudnickiej w Zakładzie Immunologii Komórkowej, Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem pomocniczym była Pani dr Magdalena Druszczyńska z tej samej jednostki naukowej.

Pomimo szczepień, gruźlica wciąż stanowi ogólnoswiatowe zagrożenie, zwłaszcza z powodu pojawiania się szczepów wielolekoopornych czy ekstremalnie opornych na leczenie. Szacuje się, iż 1/3 populacji światowej może być zakażona prątkami, jednak w zdecydowanej większości sprawnie działający system immunologiczny nie dopuszcza do rozwoju aktywnej gruźlicy. Mimo wieloletnich badań nad patologią gruźlicy, wiele pytań nadal pozostaje otwartych. Luki te ograniczają możliwości diagnozowania, monitorowania skuteczności terapii, a przede wszystkim nie pozwalają stwierdzić, jaki czynniki decydują o braku zakażenia u osób z grup ryzyka (stała ekspozycja) lub przejściu zakażenia latentnego w aktywne. Brakuje systemu „immunologicznego monitoringu”, który wskazywałby ryzyko takiej konwersji. Części tych zagadnień poświęcona jest przedstawiona rozprawa doktorska.

Ocena poprawności struktury rozprawy

Rozprawa doktorska Pana mgr Marcina Włodarczyka ma typowy układ dla pracy eksperymentalnej i mieści się na 238 stronach zawierających: Wstęp (poprzedzony wykazem skrótów), Cel pracy, opis Materiałów i Metod, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Suplement oraz Bibliografię. Zachowane zostały odpowiednie proporcje między poszczególnymi rozdziałami pracy. Dodatkowo, na końcu Doktorant umieścił swoje *Curriculum vitae*. Na wstępie podana została także informacja o źródłach finansowania badań.

Ocena merytoryczna rozprawy

Ponad czterdziestostronicowy **Wstęp** zawiera wszystkie informacje, niezbędne do wprowadzenia czytelnika w problematykę pracy. Począwszy od krótkiego rysu historycznego, Autor przedstawia współczesną sytuację epidemiologiczną gruźlicy w Polsce i na świecie zwracając uwagę na poważny problem związany z częstotliwością pojawiania się nowych przypadków gruźlicy, zwłaszcza wielolekoopornej. Opis narzędzi diagnostycznych, oprócz najpowszechniej stosowanych tzw. „złotych standardów”, zawiera także uzasadnienie wykorzystania testów interferonowych, molekularnych oraz bakteriofagów, chociaż doktorant bardzo dobrze zdaje sobie sprawę z ograniczeń ich wykonania czy interpretacji uzyskanych wyników. Przebieg gruźlicy, jej postać aktywna czy latentna, jest ściśle uzależniona od złożonej relacji - patogen a odpowiedź immunologiczna gospodarza. Wgłębiając się w to zagadnienie, Doktorant dokładnie, a zarazem przystępnie, opisuje immunopatologię gruźlicy. Preludium do opisu odpowiedzi immunologicznej wobec mykobakterii stanowi omówienie najważniejszych receptorów makrofagowych i ich interakcja z bakteryjnymi ligandami. Do tej części wstępu mam następujące spostrzeżenia:

1. na str. 36 została umieszczona informacja o IL-12, „która promuje różnicowanie się limfocytów pomocniczych Th1” – z pewnością chodzi o promowanie różnicowania limfocytów T w kierunku komórek pomocniczych Th1.
2. *M. tuberculosis* wykorzystuje receptor mannozowy (str. 39) jako jedną ze swoich strategii wniknięcia i przeżycia wewnątrz mononuklearnych fagocytów. Czy w związku z tym istnieją/są rozważane sposoby terapii molekularnej polegającej na blokowaniu tego receptora lub odpowiedniego ligandu bakterii?
3. W mojej ocenie ostatnie zdanie na str. 41 dotyczące interpretacji polimorfizmu genów kodujących DC-SIGN nie zostało jasno sformułowane: „*Jak dotąd genetyczna analiza polimorfizmu genów kodujących DC-SIGN (dwa warianty promotorowe -871G i -336A) nie wykazała istotnego wpływu na podatność na wystąpienie gruźlicy*”. Autorzy cytowanej w tym miejscu pracy donoszą bowiem, iż konsekwencją wystąpienia wariantów -871G i -336A jest raczej ochrona przed rozwojem gruźlicy. Co więcej, substytucja w pozycji -336 A/G (SNP -336A/G) powodowała hamowanie ekspresji mRNA DC-SIGN (badania *in vitro*), co ze względu na rolę tego receptora w patologii gruźlicy, ma istotne znaczenie ochronne [badanie populacji subsaharyjskiej, PLoS ONE 2008, 1:e1388]. Jednak z drugiej strony wyniki badań przeprowadzonych w Iranie wskazują, iż ta sama substytucja (-336 A/G) zwiększa ryzyko płucnej postaci gruźlicy [Journal of Microbiology, Immunology and Infection

(2014) 47, 171-175]. Tak więc w tym miejscu wstępu stosowniejsze byłoby wskazanie kontrowersji dotyczących konsekwencji polimorfizmu powyższych genów i zaznaczenie różnic wynikających z położenia geograficznego badanych populacji.

Wstęp kończy szczegółowe omówienie odpowiedzi odpornościowej na mykobakterie ze szczególnym uwzględnieniem profilu komórek immunologicznych i cytokin. (przy Ryc. 14 brakuje odniesienia do piśmiennictwa, str. 53)

Najczęściej w rozprawach doktorskich **cel pracy** sformułowany jest w postaci kilku punktów, jednak w tym przypadku Autor zdecydował się na formę opisową (punkty umieszczone są natomiast w Streszczeniu). Uważam to za dobre posunięcie, gdyż wyraźnie zostały uzasadnione przyczyny podjętych badań, sposób ich realizacji, i co ważne – co pozwoli wyjaśnić analiza wyników.

Rozdział **Materiały i Metody** został opracowany wyjątkowo starannie i zredagowany w sposób umożliwiający powtórzenie każdego doświadczenia. Zabrakło tutaj informacji o źródle materiału do badań (krew pacjentów i personelu medycznego), którą odnalazłam dopiero w opisie wyników. Warto też byłoby w tym miejscu wspomnieć o pochodzeniu charakterystyki radiologicznej pacjentów i wyników testu tuberkulinowego. W części metodycznej uwagę zwracają graficzne schematy przeprowadzanych doświadczeń, co zwłaszcza w badaniu cytometrycznym świadczy o rzetelności i wiarygodności. Do wszystkich oznaczeń immunoenzymatycznych przedstawiono krzywe wzorcowe, jednak przynajmniej w przypadku sCD14 wydaje się, iż krzywa nieliniowa byłaby bardziej odpowiednia (str. 72). Co ważne przy interpretacji wyników, została podana czułość wszystkich wykonywanych testów ELISA. Metody, którymi posługiwał się Pan mgr Marcin Włodarczyk obejmują hodowle prątków *M. bovis* BCG i *M. tuberculosis* H₃₇R_v, testy immunoenzymatyczne i cytometrię przepływową. Swoje umiejętności metodyczne potwierdza uczestnictwem w szkoleniu z zakresu wykonywania testu QuantiFERON®-TB Gold In Tube oraz kursie „Podstawy cytometrii przepływowej – zastosowania w diagnostyce”.

W omówieniu **Wyników** przyjęty został następujący porządek: ogólna i kliniczna charakterystyka uczestników badań z podziałem na grupy badawcze, profil odpowiedzi cytokinowej na antygeny mykobakterii w poszczególnych grupach, a dalej szczegółowa analiza tej odpowiedzi w zależności od etapu choroby oraz konfrontacja z wynikami testów TST i QFT. Na końcu ocenie podlega ekspresja najważniejszych w patologii gruźlicy receptorów powierzchniowych limfocytów i monocytów.

W badaniach uczestniczyło pięć grup ochotników: z aktywną gruźlicą, ostrym nieprątkowym zapaleniem płuc, zdrowych narażonych (zawodowo lub rodzinie) lub nie na kontakt z chorymi na gruźlicę. Zauważyłam, iż w Tabeli 3 (str. 79) nie zgadza się liczba uczestników badań (N) grupy KZ i KR z liczbą osób wyróżnionych pod względem zamieszkania. W charakterystyce klinicznej uwagę zwraca niska zgodność testów TST i QFT w zakresie diagnostyki aktywnej gruźlicy, za co może być odpowiedzialny, jak tłumaczy Autor w dyskusji, złożony mechanizm odpowiedzi immunologicznej uczulonych limfocytów krwi, co częściowo potwierdza wynikami badań własnych.

Analiza profilu odpowiedzi cytokinowej na atenuowane i wirulentne prątki w poszczególnych grupach ujawniła niższą zdolność pacjentów z aktywną gruźlicą do produkcji IFN- γ i (w przypadku szczepu atenuowanego) TNF- α . Z kolei ESAT-6 u tych osób okazał się skutecznym induktorem IFN- γ i IL-10. Porównanie odpowiedzi cytokinowej osób narażonych zawodowo lub rodzinie na kontakt z chorymi na gruźlicę pozwala na ogólne stwierdzenie, iż pracownicy oddziałów gruźliczych lepiej odpowiadają na antygeny rozpuszczalne (ESAT-6 i PPD), zaś członkowie rodzin - na atenuowane i wirulentne prątki. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż wyniki oznaczeń dotyczące danej cytokiny zostały zaprezentowane w różnym ujęciu statystycznym (stężenie cytokiny, odsetek producentów) i graficznym, co pozwala zobaczyć je z różnej perspektywy. Ponadto, ze względu na duże różnice osobnicze we wrażliwości na stosowane antygeny za bardzo dobry pomysł uważam graficzną prezentację silnych i słabych producentów cytokin w obrębie każdej badanej grupy. Na podstawie uzyskanych wyników testów immunoenzymatycznych, Doktorant dokonał analizy zdolności do odpowiedzi cytokinowej osób z aktywną gruźlicą, zakażeniem latentnym (QFT+) i zdrowych (QFT-) (w przypadku dwóch ostatnich grup kryterium podziału był wynik testu QFT wśród wszystkich pozostałych ochotników). Najważniejszym wnioskiem jaki wynika z tej części badań jest stwierdzenie w dalszym ciągu silnej odpowiedzi cytokinowej (IFN- γ , TNF- α) zdrowych osób z infekcją latentną na atenuowane i wirulentne prątki, nie odbiegającej istotnie od reakcji osób bez takiego zakażenia. Idąc dalej, Pan mgr Marcin Włodarczyk dokonał analizy wewnątrzgrupowej i porównał odpowiedzi na antygeny mykobakterii osób chorych oraz kontaktujących się z nimi zawodowo lub rodzinie biorąc pod uwagę obecność lub brak latentnego zakażenia *M. tuberculosis*. Tym razem, w grupie wieloletnich pracowników oddziałów gruźliczych zakażonych latentnie ujawniła się słabsza reakcja immunologiczna na atenuowane prątki *M. bovis* BCG niż u pracowników wolnych od takiego zakażenia. Potencjalne przyczyny tego stanu Autor rozważa w końcowej części Dyskusji. W kolejnych dwóch podrozdziałach Doktorant skupił się na analizie odpowiedzi cytokinowej w grupie chorych z aktywną gruźlicą w kontekście zaawansowania zmian chorobowych w płucach oraz wyników testu TST. Wszechstronna analiza z doskonałą interpretacją graficzną ujawniła związek pomiędzy wystąpieniem nacieku limfocytarnego oraz jam w płucach tych pacjentów z osłabioną odpowiedzią na antygeny prątków, najsilniej wyrażony poprzez zmniejszenie produkcji TNF- α . Z kolei jedyną różnicą pomiędzy pacjentami z dodatnim i ujemnym wynikiem testu TST była u tych pierwszych wyższa produkcja IFN- γ w odpowiedzi na antygeny rozpuszczalne. W stosunku do Rycin 74 i 76 chciałam się upewnić, czy przedstawione różnice w procentowym udziale silnych i słabych producentów IL-10 oraz TNF- α nie są statystycznie istotne? W ostatnim podrozdziale Doktorant przedstawia wyniki cytometrycznej analizy istotnych w patogenezie gruźlicy receptorów powierzchniowych komórek mononuklearnych - mCD14, LFA-1 i TLR2, jak również poziom surowiczego sCD14.

Wobec ogromnej ilości analizowanych danych, bardzo pozytywnie odbieram umieszczenie na końcu podrozdziałów krótkiego podsumowania wyników.

Muszę stwierdzić, iż jestem pod wrażeniem sprawnie poprowadzonej **Dyskusji**, tym bardziej, iż należało wziąć pod uwagę wiele zmiennych, jak stopień nasilenia choroby gruźliczej,

długość kontaktu z chorymi osobami, wyniki testów QFT i TST, i skonfrontować je z siłą odpowiedzi cytokinowej oraz stopniem ekspresji receptorów powierzchniowych najważniejszych komórek uczestniczących w odpowiedzi przeciwgruźliczej. Autor bardzo logicznie łączy ze sobą wyniki analiz i na tle piśmiennictwa rozważa je w kontekście przebiegu czy reaktywacji zakażenia mykobakteriami. Z drugiej strony Pan mgr Marcin Włodarczyk zdaje sobie sprawę z pewnych ograniczeń i stawia ostrożne wnioski, co świadczy o Jego dużej wiedzy, ale też krytycznym nastawieniu do uzyskanych wyników. Ta ostatnia cecha jest bardzo pożądana w pracy naukowej. Cała Dyskusja jest podzielona na podrozdziały, co porządkuje i znacznie ułatwia zapoznanie się ze zgromadzonym materiałem badawczym. Dodatkowym atutem jest zamieszczenie Rycin przedstawiających korelację niektórych wyników. W treści Dyskusji nie znalazłam odniesienia do Tabeli 16.

Jasno sformułowane **Wnioski** odpowiadają na wyznaczone cele pracy. Za najbardziej interesujące uważam wskazanie przez Doktoranta potencjalnie użytecznych biomarkerów odpornościowych (nasiloną ekspresja MCD14 i LFA-1) charakterystycznych dla aktywnej gruźlicy i mogących służyć (w przypadku niemożności identyfikacji obecności *M. tuberculosis* inną metodą) jako narzędzie wspomagające diagnozę, także osób z zakażeniem latentnym zagrożonych konwersją do choroby aktywnej. Jednak z drugiej strony, jak Autor sam dyskutuje, nie można z całą pewnością stwierdzić, czy wnioskowane biomarkery ułatwiają konwersję, czy też są wynikiem obecności aktywnych metabolicznie prątków. Drugim ważnym wnioskiem jest wskazanie parametrów immunologicznych (IFN- γ , TNF- α , IL-10, nadekspresja LFA-1) kluczowych w zapobieganiu zachorowania na gruźlicę w warunkach długotrwałego kontaktu z prątkującymi chorymi.

Bibliografia obejmuje 266 pozycji, w przeważającej części prac anglojęzycznych z okresu 1990-2014. Warto podkreślić, iż najnowsze piśmiennictwo (2010-2014) stanowi aż 46% przedstawionych pozycji. Wobec tak mnogiej literatury ostatnich lat potwierdza się spostrzeżenie, jak istotny jest w dalszym ciągu problem gruźlicy i zakażeń latentnych.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Obecnie, sposób przedstawienia całej pracy, a w szczególności wyników badań jest równie ważny co zawartość merytoryczna. Nawet najlepsza praca przy braku umiejętności szeroko pojętej sztuki autoprezentacji nie zyska uznania Recenzentów. W przypadku dysertacji Pana mgr Marcina Włodarczyka „koniec wieńczy dzieło”.

Cała rozprawa została napisana pięknym, poprawnym językiem polskim. Zastosowanie kolorowych przekładek ogromnie ułatwia poruszanie się w tak obszernej pracy. Doktorant dołożył wszelkich starań, aby wzbogacić tekst (Wstęp, Materiały i Metody) interesującymi rycinami i schematami, jednocześnie ich nie nadużywając. Zauważyłam i doceniam ogromną dbałość i pomysłowość Autora graficznego przedstawienia wyników, wykorzystania różnych wariantów wykresów w sposób najlepiej eksponujący istotne rezultaty. Pochwalam konsekwencję w utrzymaniu tej samej kolorystyki tabel i wykresów przy omawianiu wyników badań.

Z obowiązku Recenzenta wspomnę jedynie o nielicznych (jak na tak obszerną rozprawę) błędach typograficznych.

Podsumowanie recenzji

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi **oryginalne** opracowanie dotyczące oceny reakcji odpornościowych pacjentów z aktywną lub latentną postacią gruźlicy i próbą wyznaczenia parametrów odpowiedzialnych za unikanie przez prątki nadzoru immunologicznego oraz umożliwiających obronę przed zakażeniem lub jego konwersją do aktywnej gruźlicy w warunkach długotrwałej ekspozycji na patogen. W pełni zrealizowane cele pracy wskazały: (i) konieczność badania panelu trzech cytokin (IFN- γ , TNF- α , IL-10) w celu pełnej charakterystyki stanu odpornościowego pacjentów z aktywną gruźlicą, (ii) biomarkery przydatne do diagnozowania aktywnej gruźlicy w spornych przypadkach, (iii) nowy element mechanizmu odpowiedzialnego za zmniejszenie produkcji IFN- γ i czułości testu tuberkulinowego, (iv) biomarkery przydatne w ocenie oporności na zachorowanie i ryzyku konwersji do aktywnej gruźlicy u osób z grup ryzyka (kontakty zawodowe i rodzinne).

Pragnę nadmienić, iż przedstawione w recenzji nieliczne uwagi nie podważają w żaden sposób merytorycznej wartości pracy, są jedynie sugestią, którą może wykorzystać Autor rozprawy podczas przygotowania publikacji.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona przez Pana mgr Marcina Włodarczyka rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14.03.2003 roku (DZ.U. Nr 13.65.595 z dnia 16.04.2003) i wnoszę o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy, oryginalne podejście w opracowaniu olbrzymiej liczby danych, niezwykłą drobiazgowość i staranność w prezentacji wyników, świetną dyskusję oraz bardzo wysoki poziom edytorski rozprawy wnoszę o wyróżnienie jej stosowną nagrodą.

Zakład Wirusologii i Immunologii UMCS



prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska