

Dr hab. Nadzieja Drela, prof. nadzw.
Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii, Instytut Zoologii
Zakład Immunologii
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marcina Włodarczyka pt.

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

Praca wykonana w Zakładzie Immunologii Komórkowej, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego

Promotor: prof. dr hab. Wiesława Rudnicka

Promotor pomocniczy: dr Magdalena Druszczyńska

Według raportu WHO z 2014 roku wynika, że w 2013 roku liczba chorych na gruźlicę wyniosła około 9 milionów, zanotowano 1,5 miliona zgonów z powodu choroby, a wśród zmarłych liczba osób HIV-pozytywnych wyniosła 360 tysięcy. Raport poddaje również ocenie skuteczność diagnostyki i leczenia, dzięki którym liczba chorych na gruźlicę ulega stopniowo zmniejszeniu. Oszacowano, że dzięki efektywnym działaniom w zakresie terapii i diagnostyki uratowano łącznie 37 milionów zakażonych w okresie 2000-2013. Większość notowanych zakażeń ma postać latentną (LTBI), która nie stanowi bezpośredniego zagrożenia epidemiologicznego. Jednak szacuje się, że u części osób (około 5%) z LTBI dochodzi w ciągu 5-7 lat od zakażenia do rozwoju aktywnej gruźlicy, a u kolejnych 5% dochodzi do rozwoju choroby w późniejszym okresie. Identyfikacja zakażeń latentnych jest bardzo ważnym elementem programów walki z gruźlicą. Dodatkowym zagrożeniem w rozprzestrzenianiu się gruźlicy jest coraz większa liczba przypadków gruźlicy wielolekoopornej oraz ekstremalnie wielolekoopornej. W Polsce zachorowalność na gruźlicę jest nadal większa niż w większości krajów europejskich. Taki stan wymusza opracowywanie i realizację szeroko zakrojonych programów profilaktyki i walki z gruźlicą, co z kolei wymaga stosowania wiarygodnych testów diagnostycznych, wśród których coraz szersze zastosowanie znajdują kolejne modyfikacje testów interferonowych. Sposoby wykrywania i monitorowania aktywnej gruźlicy płuc, możliwości detekcji latentnego zakażenia prątkami gruźlicy oraz badanie wybranych mechanizmów odporności w warunkach aktywnego lub latentnego zakażenia w celu określenia potencjalnych biomarkerów odpornościowych gruźlicy są tematem rozprawy doktorskiej pana magistra Marcina Włodarczyka.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 238 stronach wszystkie wymagane rozdziały. We Wstępie Doktorant przedstawia historię badań dotyczących etiologii gruźlicy, rozwoju terapii i

szczepień przeciwgruźliczych. Charakteryzuje sytuację epidemiologiczną gruźlicy w Polsce i w skali światowej. Obszernie opisuje diagnostykę zakażeń i charakteryzuje czynniki chorobotwórczości *M. tuberculosis*. Szczegółowo omawia mechanizmy odpornościowe, w których uczestniczą komórki odporności wrodzonej aktywowane przez związki pochodzenia bakteryjnego wiązane przez PRR oraz receptory dla składników dopełniacza powstających podczas alternatywnej aktywacji. Autor pracy opisuje również rolę komórek odporności nabytej i komórek dendrytycznych niezbędnych do aktywacji i różnicowania naiwnych limfocytów Th w populacji efektorowej oraz omawia udział cytokin produkowanych przez komórki odporności wrodzonej i nabytej w regulacji odpowiedzi odpornościowej w przebiegu gruźlicy. Autor podkreśla, że mykobakterie, w tym prątki gruźlicy są silnymi induktorami odpowiedzi typu komórkowego, która w zależności od wirulencji prątków i statusu odpornościowego gospodarza decyduje o eliminacji bakterii lub ułatwia rozwój choroby. Czy znane są wyniki badań lub hipotezy wyjaśniające takie przeciwstawne skutki odpowiedzi komórkowej? Czy ma to związek z mechanizmami unikania odpowiedzi odpornościowej przez mykobakterie? Odpowiedź na te pytania wydaje się istotna w kontekście badań, których celem jest określenie potencjalnych biomarkerów odpornościowych gruźlicy.

Autor rozprawy obszernie i w sposób jasny określa cel pracy. Zakres badań mających na celu określenie potencjalnych markerów odpornościowych gruźlicy jest duży i może dlatego nie znalazłam uzasadnienia merytorycznego dla wyboru markerów komórkowych zaproponowanych przez Autora do analizy fenotypowej jednojądrzastych leukocytów krwi obwodowej: dlaczego TLR2, CD3, LFA-1, a nie inne markery, których ekspresja również ulega zmianie w wyniku infekcji prątkami gruźlicy?

W rozdziale Materiały i metody można było uniknąć wyszczególniania zastosowanych standardowych odczynników chemicznych, drobnego sprzętu laboratoryjnego i standardowej aparatury. Wystarczające jest wskazanie typu aparatury (cytometru przepływowego, czytnika do pomiaru absorbancji czy spektrofotometru UV) w rozdziale z opisami metod.

Badaniami objęto dużą grupę osób (224), co jest szczególnie ważne w analizie przydatności testów diagnostycznych oraz określania markerów odpornościowych i ich korelacji z pozytywnymi wynikami testów. Dokonano bardzo dokładnej charakterystyki osób zaklasyfikowanych do poszczególnych grup badawczych. Wyniki badań zostały przedstawione na 50 rycinach i 10 tabelach (nie wliczając tabel i rycin z charakterystyką badanych grup). Zwraca uwagę przejrzystość opisu, doskonała graficzna prezentacja wyników z zaznaczeniem istotności statystycznej. Wyczerpujące podpisy pod rycinami ułatwiają śledzenie wyników. Imponujące jest wykorzystanie wyników stężenia cytokin czy ekspresji markerów komórkowych do wielokierunkowych porównań uwzględniających wyniki testów diagnostycznych w obrębie poszczególnych grup, czy też zróżnicowania stopnia zaawansowania zmian gruźliczych w grupie pacjentów TB. Szkoda, że nie wykonano analogicznych

analiz w obrębie grup w zależności od płci zważywszy dymorfizm płciowy układu odpornościowego. Po każdym etapie badań zamieszczono odpowiednie podsumowanie, podkreślające ważne obserwacje i wnioski. Moją uwagę zwróciły wyniki dotyczące stężenia IL-10 oraz ekspresji CD3:

- w zależności od stopnia zaawansowania zmian gruźliczych (obecność jam w płucach pacjentów z aktywną gruźlicą) obserwowano nasiloną produkcję IL-10 w hodowlach stymulowanych antygenem ESAT-6. Jak wiadomo rozwój odporności na prątki gruźlicy zależy od aktywności limfocytów Th1. Czy obserwowana zwiększona produkcja IL-10 upoważnia nas do wniosku o przekierowaniu odpowiedzi odpornościowej na typ Th2 występujący zwykle w przypadku wielolekooporności? Czy śledzono skutki terapii pacjentów?

- jakie może być znaczenie zwiększenia ekspresji CD3 na limfocytach T w grupie pacjentów z aktywną gruźlicą? Czy ta analiza została właściwie zaplanowana? Czy nie należało raczej analizować ekspresję tego markera w obrębie populacji limfocytów T (CD3+) i limfocytów NKT (CD3^{dim}CD56+) osobno, zważywszy że obecność limfocytów NKT CD3^{dim} jest wskaźnikiem aktywnego układu odpornościowego w infekcji *M. tuberculosis*. Czy zwiększenie ekspresji CD3 w analizie opisanej w pracy nie jest przejawem zmniejszenia liczby limfocytów NKT CD3^{dim}?

Ważną i dojrzałą częścią pracy jest przeprowadzona na 32 stronach dyskusja wyników w oparciu o bogate piśmiennictwo, 266 pozycji literaturowych. Autor rozprawy wnikliwie podsumowuje analizowane wcześniej wyniki pod kątem ich przydatności w diagnostyce infekcji mykobakteryjnych, czy też monitorowaniu terapii przeciwprątkowej. Wnioski formułowane w dyskusji dokumentuje za pomocą rycin, zamieszczonych w rozdziale Dyskusja i w suplemencie, wskazujących na zależność fenotypu monocytów i wyniku rutynowych testów diagnostycznych (TST, QFT) oraz syntezy wybranych cytokin w poszczególnych grupach osób.

Autor rozprawy podsumowuje znaczenie uzyskanych wyników i formułuje końcowe wnioski.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na nieliczne nieścisłości terminologiczne. Termin „układ immunologiczny” jest nieprawidłowy, aczkolwiek powszechnie stosowany w żargonie naukowym. Immunologia to nauka o odporności, a termin prawidłowy określający układ anatomiczno-funkcjonalny to „układ odpornościowy” (ang. „immune system”, a nie „immunological system”). Z dużą dowolnością Autor używa terminu „populacja” komórek: raz określając tym terminem komórki o podobnej funkcji, a raz o określonym fenotypie. I tak, komórki dendrytyczne nie należą do populacji komórek prezentujących antygen, lecz wykazują zdolność do prezentowania antygeny. Populacje różnych komórek układu odpornościowego określamy poprzez ich fenotyp.

Istotne, mocne strony rozprawy doktorskiej pana Marcina Włodarczyka: bardzo dobra prezentacja wyników zarówno od strony graficznej jak i ich analizy statystycznej, bardzo dojrzała dyskusja świadcząca o znajomości problematyki badawczej i zagadnień epidemiologicznych, bardzo dobry

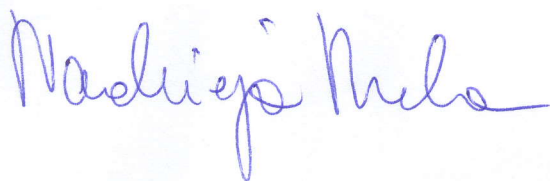
pomysł z rozdzieleniem tak dużej liczby rycin na część dokumentującą wyniki uzyskane dla poszczególnych badanych grup oraz przygotowanych na potrzeby dyskusji, rzadko spotykana umiejętność wykorzystywania tak dużej liczby wyników do merytorycznej i dobrze zaplanowanej dyskusji. Bardzo dużą zaletą całej rozprawy jest jej potencjał do inspiracji dalszych badań. Autor rozprawy wykazuje zdecydowane przywiązanie do faktów naukowych, co oczywiście jest zaletą, a moją intencją jest sprowokowanie dobrze rozumianej fantazji naukowej. Dlatego też, kończąc moje uwagi, prosilibym pana Marcina Włodarczyka, o przedstawienie propozycji dalszych badań wynikających z uzyskanych w trakcie badań wyników.

Brak jest słabych stron pracy, co stanowi dodatkowe osiągnięcie jej Autora.

Praca napisana jest bardzo starannie, logicznie, a poziom merytoryczny świadczy o dużej wiedzy Autora i umiejętności jej wykorzystywania przy formułowaniu założeń pracy i dyskusji wyników. Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalnym i wartościowym dorobkiem pana Marcina Włodarczyka. Według mojej oceny spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595).

Ponadto, część wyników badań pana Marcina Włodarczyka została opublikowana w czasopismach krajowych i zagranicznych (2 artykuły w czasopismach z listy filadelfijskiej i 2 w czasopismach polskich) oraz udostępniona w formie komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych (łącznie 18). Dodatkowo pan Marcin Włodarczyk jest współautorem 4 prac poglądowych opublikowanych w czasopismach polskich. Uzupełnieniem dorobku naukowego niezwiązanego z rozprawą doktorską są 2 prace oryginalne i 11 komunikatów konferencyjnych.

Dlatego z głębokim przekonaniem składam do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego wniosek o dopuszczenie mgr Marcina Włodarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego, na podstawie rozprawy, zatytułowanej „Profil odpowiedzi cytokinowej na antygeny mykobakterii oraz ekspresja receptorów przekazywania sygnałów w aktywnej gruźlicy i latentnym zakażeniu *Mycobacterium tuberculosis*” oraz wnioskuję o wyróżnienie jej stosowną nagrodą.



Warszawa, 20.01.2015