



Prof. dr hab. Magdalena Klink  
Instytut Biologii Medycznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Lodowa 106, 93-232 Łódź

Łódź, dn. 12.04.2021

## OCENA

### rozprawy doktorskiej mgr Sebastiana Wawrockiego

**pt. „Analiza molekularna i funkcjonalna interleukiny 18 (IL-18), jej receptora (IL-18R) i białka wiążącego IL-18 (IL-18BP) w aktywnej gruźlicy i latentnym zakażeniu gruźliczym”.**

Gruźlica mimo stosowanych na szeroką skalę szczepień 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. W 2019 roku odnotowano na świecie ponad 7 milionów nowych przypadków gruźlicy, z powodu której zmarło prawie 1,5 miliona osób. Strategia walki z tą niekorzystną sytuacją jest wielokierunkowa i opiera się głównie na poszukiwaniu nowych tarcz terapeutycznych i udoskonalaniu dostępnych leków przeciwgruźliczych, opracowywaniu skuteczniejszych szczepionek oraz na lepszym poznaniu komórkowych i humoralnych mechanizmów odpowiedzi przeciwprątkowej gospodarza. Ten ostatni kierunek badań jest niezwykle istotny wobec faktu, że u 10% osób z utajoną postacią zakażenia może dojść do reaktywacji prątków gruźlicy i choroba przechodzi w formę aktywną.

Praca doktorska mgr Sebastiana Wawrockiego mieści się w nurcie badań nad czynnikami układu odpornościowego rozwijającymi się w zakażeniu prątkami gruźlicy i/lub w aktywnej formie choroby. Kluczowym elementem odpowiedzi odpornościowej na mykobakterie jest uwalnianie przez komórki T interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), którego zadaniem jest aktywacja makrofagów i uruchomienie w nich mechanizmów bójczych pozwalających na zabicie pochłoniętych prątków gruźlicy. Wśród licznych stymulatorów produkcji IFN- $\gamma$ , wyróżnia się interleukinę 18 (IL-18). Ta prozapalna i oddziałująca plejotropowo cytokina jest obecnie badana pod kątem znaczenia w rozwoju odporności przeciwprątkowej.

Za cel pracy Doktorant postawił sobie zweryfikowanie hipotezę, że IL-18 wraz z białkami tworzącymi z nią funkcjonalny kompleks może być czynnikiem różnicującym postać latentną od aktywnej gruźlicy oraz zakażenie gruźlicze od zapalenia płuc wywołanego innymi czynnikami. Poszukiwania biomarkerów gruźlicy są obecnie ważnym nurtem badań i szczerze gratuluję Doktorantowi i Promotorowi tak znakomitego pomysłu. Kolejnym celem pracy była próba poszerzenia wiedzy o udziale tej ważnej cytokiny w ryzyku zachorowania na gruźlicę oraz w

inicjonowaniu odpowiedzi odpornościowej przez mykobakterie. Moim zdaniem jednak ten drugi cel został osiągnięty w niewielkim stopniu gdyż prace będące rozprawą doktorską w znakomitej większości dotyczą IL-18 jako biomarkera. Nie mniej jednak uważam, że cytokina ta jako cel badań w różnych aspektach gruźlicy to jak najbardziej aktualny pomysł, który zasługuje na realizację i całkowicie go popieram. Mam jednak zastrzeżenia do sformułowania w „omówieniu doktoratu” celu ogólnego, który jest moim zdaniem przedstawiony niejasno i wymaga kilkakrotnego czytania. Natomiast cel szczegółowy 3 można było rozbić na dwa oddzielne, wskazujące na oznaczenia ilościowe w surowicy i w nadsączach hodowlanych komórek. Te uwagi z oczywistych względów nie odnoszą się do *meritum* pracy doktorskiej czyli samych publikacji.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Sebastiana Wawrockiego ma formę cyklu 4 prac eksperymentalnych i 2 prac przeglądowych opublikowanych w latach 2015-2020, w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Report/Thomson Reuter. Całkowity Impact Factor zamieszczonych prac wynosi 12,933, natomiast liczba punktów MNiE równa jest 370. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, natomiast w dwóch również autorem do korespondencji. W pięciu spośród sześciu prac Doktorant miał znaczący 60-80 % udział. Swoje badania mgr Wawrocki mógł zrealizować dzięki grantowi NCN Preludium, którego był kierownikiem. Był też kilkakrotnie beneficjentem dotacji celowej UŁ na działalność związaną z prowadzeniem prac naukowych i rozwojowych. Gratuluję Doktorantowi skuteczności w zdobywaniu środków finansowych.

Załączone publikacje stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały opatrzone syntetycznym wstępem zawierającym cele naukowe, wykorzystane materiały i metody badawcze oraz podsumowanie wyników przeprowadzonych badań. Wnioski końcowe mgr Wawrocki poprzedził listą najważniejszych wyników, co jest dobrym uzupełnieniem omówionych prac doświadczalnych. Proszę Doktoranta o przybliżenie metody hodowli leukocytów pełnej krwi obwodowej z antygenami prątków gruźlicy. Jakie antygeny wykorzystywał, jaki był czas hodowli, czy lizowano erytrocyty.

Pierwsza praca jest to artykuł przeglądowy, w którym mgr Wawrocki wraz ze współautorami wyczerpująco opisał biologiczną aktywność IL-18 oraz jej potencjalną istotność w infekcjach w tym prątkami gruźlicy. Ciekawym podejściem do tematu IL-18 jest dyskusja autorów na temat zalet i wad zastosowania tej cytokiny jako czynnika terapeutycznego regulującego aktywność komórek immunologicznie kompetentnych np. w alergiach lub zakażeniach bakteryjnych.

Druga publikacja jest to również praca przeglądowa autorstwa Doktoranta i jego Promotora i dotyczy mediatorów zapalenia jakimi są inflamasomy i ich roli w zakażeniach wywołanych prątkami gruźlicy. Inflamasomy są kompleksem białkowym aktywowanym w komórkach odpornościowych w wyniku pobudzenia receptorów rozpoznających wzorce molekularne

patogenów w tym prątków gruźlicy i mają plejotropowe, głównie pro-zapalne działanie na układ odpornościowy. Interleukina 18 będąca przedmiotem badań Doktoranta jest przekształcana z formy prekursorowej w aktywną przy udziale kaspazy 1 enzymu z grupy inflamasomów. Także zasadność włączenia tego artykułu do pracy doktorskiej nie budzi moich zastrzeżeń.

W pierwszej z prac doświadczalnych opisano, że brak jest zależności między częstością występowania dwóch wariantów polimorficznych w obrębie promotora genu dla IL-18 (IL-18/-607 C/A i IL-18/-137 G/C), a zachorowalnością na gruźlicę. Uzyskane przez Doktoranta wyniki na populacji polskiej są spójne z danymi opublikowanymi w ostatnich latach przez innych autorów podkreślających, iż polimorfizmy genu *IL-18* w rejonie promotorowym nie mają znaczenia w osobniczej wrażliwości za zakażenie prątkami gruźlicy.

W kolejnej publikacji skoncentrowano się na ocenie poziomów mRNA dla IL-18 i IFN- $\gamma$  oraz dla białek hamujących aktywność prozapalną IL-18 czyli białka wiążącego tę cytokinę (IL-18BP) oraz IL-37 wykazującej powinowactwo do receptora dla IL-18 (IL-18R), w leukocytach pełnej krwi obwodowej pacjentów z aktywną i latentną gruźlicą oraz u osób zdrowych. Stwierdzono, że leukocyty osób z utajoną i aktywną gruźlicą wykazują nasiloną, jednakże porównywalną ekspresję *IL-18* oraz *IL-18BP*. Dobrym markerem okazał się natomiast receptor dla IL-18 oraz IFN- $\gamma$ . Leukocytarny poziom mRNA tych czynników był odpowiednio niższy i wyższy u pacjentów z latentną gruźlicą w porównaniu to osób z aktywną formą zakażenia. Ekspresja *IL-18* i towarzyszące jej białka jako wskaźniki/biomarkery mają bez wątpienia potencjalną wartość przy diagnozie gruźlicy. Natomiast byłabym bardzo ostrożna w formułowaniu na podstawie poziomów mRNA wniosków na temat stanu układu odpornościowego pacjentów czy ich istotności jako czynników regulujących fazę utajoną i aktywną gruźlicy. Myślę, że ten wniosek jest zbyt daleko idący i proszę Doktoranta o szersze wyjaśnienie podczas obrony. Należy pamiętać, że nie ma linearnej zależności między poziomem mRNA a poziomem aktywnego białka w komórce.

Trzecia praca doświadczalna jest kontynuacją oceny przydatności IL-18 jako biomarkera gruźlicy. Interesujące wyniki, opublikowane w PLoS One pokazują, że w surowicy pacjentów z aktywnym zakażeniem obserwuje się wyższe stężenia: IL-18 wolnej i związanej z białkiem, samego białka wiążącego IL-18, IFN- $\gamma$  i chemokiny IP-10 oraz niższy poziom IL-37 w porównaniu do osób zdrowych i osób z utajoną formą zakażenia. Wykazano również, że stężenie IL-18 i IL-18BP jest nasilone, natomiast IFN- $\gamma$  obniżone w nadsączach hodowlanych leukocytów krwi obwodowej, stymulowanych antygenami prątków gruźlicy, osób z aktywną gruźlicą. Różnice w stężeniu IFN- $\gamma$  w surowicy i nadsączach hodowlanych leukocytów Doktorant tłumaczy obecnością zjawiska immunosupresji w czynnej gruźlicy. Proszę mgr Sebastiana Wawrockiego o szersze skomentowanie zjawiska immunosupresji w gruźlicy. Analiza statystyczna pokazała, że w/w czynniki mają duży potencjał jako biomarkery aktywnego zakażenia. Największą siłą rozróżniającą aktywną gruźlicę od formy utajonej ma stosunek ilościowy IL-18/IL-18BP, IL-18/IL-37, IL-18/IFN- $\gamma$  oraz IL-18BP/IP-

10. Natomiast w rozróżnieniu aktywnego i utajonego zakażenia w przypadku nadsączy hodowlanych najbardziej obiecująca okazała się proporcja ilościowa IL-18/IFN- $\gamma$ . W tym miejscu proszę Doktoranta o wyjaśnienie celu włączenia do badań chemokiny IP-10.

W ostatniej publikacji wykazano, że nasilony surowiczy poziom IL-18 i IL-18BP jest charakterystyczny dla pacjentów z zaawansowaną gruźlicą. Natomiast surowicze wysokie stężenie IL-18BP bez wzmożonego stężenia cytokiny obserwuje się wśród chorych z łagodnym i umiarkowanym stadium choroby. Doktorant słusznie zauważył, iż u osób w zaawansowanym stanie gruźlicy dochodzi do nadprodukcji IL-18 i może to wskazywać na potencjalną rolę tej cytokiny w rozwoju choroby. W pracy opisano również, iż najlepszą wartość diagnostyczną w odróżnianiu aktywnej gruźlicy od nie gruźliczego zapalenia płuc mają IL-18BP i IP-10. Natomiast w diagnostyce łagodnej/umiarkowanej postaci gruźlicy i zapalenia płuc innego pochodzenia warto skorzystać z proporcji wolnej IL-18 do IL-10 oraz wolnej IL-18 do IL-18BP. Największą wartość diagnostyczną w rozróżnianiu zaawansowanej aktywnej gruźlicy od nie gruźliczego zapalenia płuc miały pary białek IL-18 i IFN- $\gamma$  oraz IL-18BP i IFN- $\gamma$ .

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pana mgr Sebastiana Wawrockiego stwierdzam, że stanowi ona niezwykle istotny wkład w poszukiwanie biomarkerów gruźlicy. Doktorant niebicie wskazał na duży potencjał diagnostyczny surowiczego stężenia IL-18 i/lub białek z nią związanych w diagnostyce aktywnego zakażenia płuc mykobakteriami. Ponadto przedstawione prace pokazują również, że IL-18 może mieć istotną rolę w rozwoju aktywnej postaci gruźlicy. Chcę również podkreślić, że mgr Wawrocki jest współautorem 7 publikacji niewchodzących w pracę doktorską o łącznym Impact Factor = 18,052 i całkowitej liczbie punktów MNiE równiej 320. Jest też współautorem licznych doniesień na konferencjach krajowych i zagranicznych. Uważam, że całkowity dorobek naukowy Pana mgr Sebastiana Wawrockiego jest bardzo dobry i gratuluję zarówno Doktorantowi jak i Promotorowi tak owocnych badań. Moje uwagi i zastrzeżenia zawarte w recenzji są natomiast odzwierciedleniem dużego zainteresowania tematem i chęcią podyskutowania z Doktorantem podczas obrony.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem wnoszę wniosek do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Sebastiana Wawrockiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Pracowni Biologii Molekularnej i Komórkowej  
Instytutu Biologii Medycznej PAN

*Prof. dr hab. Magdalena Klink*