
1. Imię i nazwisko: **Magdalena Druszczyńska**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

- **dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, specjalność mikrobiologia**, uchwała Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 25 marca 2003r. Temat rozprawy doktorskiej „Odpowiedź proliferacyjna i sekrecyjna na antygeny mykobakterii u zdrowych osób szczepionych BCG i chorych na gruźlicę”

- **dyplom magistra biologii w specjalności mikrobiologia**, 1999, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki. Temat pracy magisterskiej „Kompleksy immunologiczne w zakażeniach wywoływanych przez pałeczki *Helicobacter pylori*”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

1999-2001	doktorant w Zakładzie Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego
2001-2003	asystent w Zakładzie Biologii Infekcyjnej UŁ, później w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego
od 01.10.2003	adiunkt w Zakładzie Immunologii Komórkowej Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 ze zm.):

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 11 publikacji (7 prac oryginalnych i 4 prace poglądowe) ujętych pod wspólnym tytułem: ***Profile odpowiedzi komórkowej oraz mykobakteryjne markery w aktywnym i latentnym zakażeniu Mycobacterium tuberculosis***, których łączny IF= 14,592 (194 pkt MNiSzW).

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi:

Prace oryginalne:

A1. Druszczyńska M., Włodarczyk M., Kielnierowski G., Kawka M., Rudnicka W. Two-year follow-up study of *Mycobacterium tuberculosis* antigen-driven IFN- γ responses and macrophage sCD14 levels after tuberculosis contact. *Indian J Microbiol* 2016 56(2): 205–213 doi: 10.1007/s12088-016-0571-y

IF=0,899; MNiSzW: 15 pkt

Udział habilitanta: 65%, współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części eksperymentalnej (jakościowa i ilościowa ocena poziomu IFN-gamma w zakładanych hodowlach pełnej krwi), współudział w analizie statystycznej uzyskanych wyników, opracowanie graficzne otrzymanych danych i ich interpretacja, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny

A2. Włodarczyk M., Rudnicka W., Janiszewska-Drobińska B., Kielnierowski G., Kowalewicz-Kulbat M., Fol M., Druszczyńska M. Interferon-gamma assay in combination with tuberculin skin test are insufficient for the diagnosis of culture-negative pulmonary tuberculosis. *PLoS One* 2014 Sep 15;9(9):e107208. doi: 10.1371/journal.pone.0107208.

IF=3,534; MNiSzW: 40 pkt

Udział habilitanta: 50%, współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części eksperymentalnej (testy interferonowe pełnej krwi u pacjentów z TB, ilościowa analiza poziomu produkowanego IFN-gamma), opracowanie i interpretacja analizy statystycznej uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny

A3. Druszczyńska M., Włodarczyk M., Janiszewska-Drobinska B., Kielnierowski G., Zawadzka J., Kowalewicz-Kulbat M., Fol M., Szpakowski P., Rudnicka K., Chmiela M., Rudnicka W. Monocyte signal transduction receptors in active and latent tuberculosis. *Clin Dev Immunol* 2013, ID 851452, doi:10.1155/2013/851452

IF=2,934; MNiSzW: 20 pkt

Udział habilitanta: 40%, współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części eksperymentalnej (cytometryczna ocena ekspresji receptorów na komórkach monocytarnych, wykonanie testów interferonowych, immunoenzymatyczna ocena stężenia surowiczego sCD14), współudział w opracowaniu i interpretacji wyników, współudział w przygotowaniu manuskryptu

- A4. Szewczyk R., Kowalski K., Janiszewska-Drobińska B., Druszczyńska M. Rapid method for *Mycobacterium tuberculosis* identification using electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of mycolic acids. *Diag Microbiol Infect Dis* 2013, 76: 298-305, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.025

IF=2,568; MNiSzW: 25 pkt

*Udział habilitanta: 30%, współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części eksperymentalnej (opracowanie procedury ekstrakcji lipidów ściany komórkowej mykobakterii, izolacja kwasów mykolewowych bezpośrednio z materiału klinicznego oraz po założeniu 10-dniowych hodowli, ocena obecności wybranych kwasów mykolewowych u mikroorganizmów spoza rodzaju *Mycobacterium*, analiza jakościowa uzyskanych ekstraktów, ocena wartości diagnostycznej opracowanej metody LC-MS/MS), współudział w opracowaniu statystycznym i interpretacji wyników, współudział w przygotowaniu manuskryptu*

- A5. Druszczyńska M., Strapagiel D., Rudnicka W. Molekularne i komórkowe parametry w gruźlicy. *Nowa Medycyna*, 1/2009, s. 43-47

IF=-; MNiSzW: 4 pkt

Udział habilitanta: 65%, autor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części eksperymentalnej (analiza polimorfizmu genów kodujących receptory TLR2 (Arg677Trp, Arg753Gln) i TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile), udział w opracowywaniu i interpretacji wyników, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny

- A6. Strapagiel D., Kasztalska K., Druszczyńska M., Kowalewicz-Kulbat M., Vrba A., Matusiak A., Chmiela M., Rudnicka W. Monocyte response receptors in BCG driven delayed type hypersensitivity to tuberculin. *Folia Histochem Cytobiol* 2008, 46(3): 353-359

IF=1,213; MNiSzW: 15 pkt

Udział habilitanta: 35%, współudział w wykonaniu pracy eksperymentalnej (ocena polimorfizmu genów kodujących receptor CD14 i lektynę wiążącą mannozę, immunoenzymatyczna ocena stężenia sCD14), współudział w dyskusji naukowej i opracowaniu naukowego celu pracy

- A7. Druszczyńska M., Strapagiel D., Kwiatkowska S., Kowalewicz-Kulbat M., Różalska B., Chmiela M., Rudnicka W. Tuberculosis bacilli still posing a threat. Polymorphism of genes regulating anti-mycobacterial properties of macrophages. *Pol J Microbiol* 2006, 55(1): 7-12

IF =-; MNiSzW: 15 pkt

Udział habilitanta: 50%, współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu pracy eksperymentalnej (izolacja DNA, analiza wybranych polimorfizmów genetycznych metodą PCR i PCR-RFLP, ocena surowiczego poziomu sCD14), współudział w opracowaniu statystycznym i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu

Prace pogładowe:

- A8. Fol M., Druszczyńska M., Włodarczyk M., Ograczyk E., Rudnicka W. Immune response gene polymorphisms in tuberculosis. *Acta Biochim Pol* 2015; 62(4): 633-40. doi: 10.18388/abp.2015_1130.

IF=1,389; MNiSzW: 15 pkt

Udział habilitanta: 45%, współudział w opracowaniu naukowego celu i koncepcji artykułu, dyskusja koncepcyjna, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny manuskryptu, pierwszy i drugi autor mają równy wkład w powstanie pracy

A9. Kowalski K., Trzepinski P., Druszczyńska M., Boratynski J. Mycolic acids – biological role and potential application in *Mycobacterium* detection and differentiation. *Post Hig Med. Dosw* 2014, 68:350-8. doi: 10.5604/17322693.1097425

IF=0,633; MNiSzW: 15 pkt

Udział habilitanta: 40%, współudział w opracowaniu koncepcji artykułu i dyskusji naukowej, udział w przygotowaniu manuskryptu

A10. Druszczyńska M., Kowalewicz-Kulbat M., Fol M., Włodarczyk M., Rudnicka W. Latent *M. tuberculosis* infection – pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies. *Pol J Microbiol* 2012, vol 61, no 1, 3-10

IF=0,768; MNiSzW: 15 pkt

Udział habilitanta: 70%, autor koncepcji pracy, bezpośredni udział w zbieraniu, analizie i wykorzystaniu danych źródłowych, dyskusja koncepcyjna oraz przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny

A11. Druszczyńska M., Włodarczyk M., Fol M., Rudnicka W. Rozpoznawanie antygenów prątków przez fagocyty. *Post Hig Med. Dosw* 2011, 65: 23-39

IF=0,654; MNiSzW: 15 pkt

Udział habilitanta: 60%, opracowanie naukowego celu pracy, przygotowanie koncepcji pracy, zebranie materiałów źródłowych, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny manuskryptu

Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5.

I. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

I.1. Wprowadzenie

Gruźlica (TB; tuberculosis) wywoływana przez prątki gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) pozostaje jedną z najgroźniejszych chorób zakaźnych, umieszczanych obok AIDS i malarii na czele chorób zakaźnych zagrażających zdrowiu człowieka. Z danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) wynika, że 1/3 populacji ludzi na świecie jest zakażona *M.tb* w sposób utajony (latentny) stanowiąc rezerwuar wirulentnych prątków w środowisku. W odróżnieniu od aktywnej postaci gruźlicy, zakażenie latentne (LTBI; ang. *Latent Tuberculosis Infection*) ma przebieg bezobjawowy i nie stanowi bezpośredniego zagrożenia epidemiologicznego [10]. Szacuje się jednak, że u około 5-10% osób z tej grupy dochodzi do rozwoju czynnej gruźlicy w pewnym okresie ich życia, a tym samym do transmisji żywych, wirulentnych, aktywnych metabolicznie bakterii do otoczenia [32, 37]. Problem reaktywacji uspionych zakażeń gruźliczych narasta wraz ze zwiększającą się liczbą osób z osłabioną odpornością, pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi i nowotworowymi, przyjmujących leki o działaniu immunosupresyjnym, ale także osób w starszym wieku, stanowiących grupę wysokiego ryzyka rozwoju aktywnej gruźlicy.

Pomimo przyjętego powszechnie standardu leczenia i ponad 80-letniego stosowania przeciwgruźliczej szczepionki BCG (Bacille Calmette-Guérin), gruźlica stanowi wciąż olbrzymi ogólnoswiatowy problem epidemiologiczny. Rocznie w świecie notuje się 7-10 milionów nowych zachorowań na gruźlicę, która jest przyczyną śmierci około 3 milionów ludzi w ciągu roku [46]. Mimo, że najwięcej zachorowań na gruźlicę obserwuje się w krajach tropikalnej Afryki i południowoschodniej Azji, gruźlica nie jest chorobą rzadką również w Europie. W Polsce, współczynnik zapadalności na gruźlicę jest znamienne wyższy niż w krajach Europy Zachodniej i wynosi średnio 17,4 przypadków na 100 000 mieszkańców (2014) [20]. W różnych regionach kraju występuje jednak duże zróżnicowanie zachorowalności na gruźlicę, od około 10/100.000 mieszkańców/rok w województwach zachodnich do około 22-25/100.000 mieszkańców/rok w województwach lubelskim, śląskim, świętokrzyskim i łódzkim. Relatywnie wysokie są również odsetki osób z utajonymi zakażeniami *M.tb*, które trwają całe życie i w każdej chwili, także w zaawansowanym wieku, mogą przejść w aktywną postać gruźlicy. W regionie łódzkim blisko 13% dorosłych ludzi wykazuje stan utajonego zakażenia prątkami gruźlicy [**publikacja A3**]. Zagrożenie gruźlicą wzrasta wraz ze wzrostem częstości izolowania wielolekoopornych szczepów *M.tb*, brakiem nowych leków przeciwgruźliczych, koinfekcją *M.tb* i wirusa HIV, brakiem prostych, szybkich i niezawodnych testów diagnozowania zakażeń *M.tb* i niewystarczającą efektywnością protekcyjną stosowanej szczepionki. Współistnienie zakażenia prątkami *M.tb* i wirusem HIV nie tylko zwiększa ryzyko zachorowania na gruźlicę, ale także pogarsza jej przebieg prowadząc do wysokiej śmiertelności wśród zakażonych.

Eksperci WHO szacują, że koinfekcja HIV zwiększa 30-krotnie ryzyko rozwoju gruźlicy, zarówno wskutek reaktywacji wygaszonych ognisk gruźliczych, jak i w wyniku zakażeń nowo nabywanych. Ryzyko zachorowania na gruźlicę osób z jednoczesną koinfekcją *M.tb* i HIV wzrasta z około 6% w ciągu przeciętnego trwania życia do około 8-10% w skali roku. Zakażenie HIV może być więc odpowiedzialne za wzrost liczby przypadków gruźlicy o 30-50%, a na obszarach o bardzo wysokim odsetku osób zakażonych HIV nawet o kilkaset procent. Szczególne zagrożenie epidemiologiczne stanowią wielolekooporne prątki *M.tb*, zarówno typu MDR (ang. *Multi drug resistant*), oporne na dwa spośród czterech leków podstawowego leczenia, rifampicynę i izoniazyd, typu XDR (ang. *Extensively drug resistant*), z opornością na dodatkowe leki przeciwgruźlicze, oraz TDR (ang. *Totally drug resistant*), oporne na wszystkie dostępne tuberkulostatyki [11]. Wśród 12 milionów zachorowań na gruźlicę na świecie w roku 2014 stwierdzono 480.000 przypadków gruźlicy MDR, z czego więcej niż połowę w Indiach, Chinach i Rosji [46]. Wielolekooporne szczepy MDR *M.tb* odnotowano w 15 krajach europejskich, w tym w graniczących z Polską - Rosji, Ukrainie, Białorusi, a także w Mołdawii i krajach nadbałtyckich. Średnio 9% zachorowań na gruźlicę wielolekooporną stanowiły przypadki XDR, najczęściej w Tadżykistanie, Azerbejdżanie i na Litwie. W Polsce w roku 2014 zarejestrowano 21 przypadków gruźlicy wielolekoopornej typu MDR, co stanowiło 0,8% ogółu chorych na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie [20]. Trudności w diagnozowaniu gruźlicy wielolekoopornej oraz wysokie koszty leczenia powodują, że gruźlica powraca na listę chorób nieuleczalnych.

Wykrywanie gruźlicy, obok zapobiegania i leczenia, pozostaje istotnym elementem większości światowych programów walki z tą chorobą. Uważa się, że słabsze od oczekiwanych efekty już 20-letniej realizacji międzynarodowego programu zwalczania gruźlicy DOTS (ang. *Directly-observed treatment, short course*) spowodowane są brakiem szybkich i wiarygodnych metod diagnozowania gruźlicy. Zgodnie z zaleceniami WHO stwierdzenie przypadku gruźlicy wymaga mikrobiologicznego potwierdzenia, co wiąże się z koniecznością wyizolowania bakterii z materiału klinicznego, określenia przynależności gatunkowej drobnoustrojów oraz określenia profilu lekooporności koniecznego dla ustalenia optymalnego schematu leczenia. Pomimo dostępności szeregu różnych technik diagnostycznych chorych na gruźlicę rutynowo najczęściej diagnozuje się, poza oceną kliniczną i radiologiczną, na podstawie obecności prątków kwasoopornych w preparatach mikroskopowych (bakterioskopia), obserwacji wzrostu bakterii w 6-8 tygodniowych hodowlach oraz wyniku skórniego testu tuberkulinowego. Ta standardowa procedura diagnostyki gruźlicy nie umożliwia jednak diagnozowania wszystkich zakażonych *M.tb* pacjentów. Badanie mikroskopowe charakteryzuje niska czułość i niemożność rozróżnienia prątków gruźlicy od niegruźliczych. Czułość i swoistość metod opartych o amplifikowanie mykobakteryjnych kwasów nukleinowych jest zmienna, a ich stosowanie wymaga specjalistycznego wyposażenia, którego brak w większości rutynowych laboratoriach prątka. Szczególnie trudne jest diagnozowanie gruźlicy u dzieci; tylko u co czwartego dziecka chorego na gruźlicę udaje się ją potwierdzić bakteriologicznie. Jak wskazują wyniki naszych wieloletnich badań, które znajdują potwierdzenie w danych literaturowych, żadna z obecnie dostępnych

mikrobiologicznych, serologicznych lub genetycznych metod diagnostycznych nie jest wystarczająco skuteczna w potwierdzeniu aktywnej gruźlicy płuc u 20-40% pacjentów. Wskaźnik śmiertelności u takich pacjentów jest wyższy niż wśród chorych z mikrobiologicznie potwierdzoną gruźlicą. Brak diagnozy stwarza poważne konsekwencje zmuszając klinicystów do podejmowania empirycznej terapii, która w przypadku chorych zakażonych lekoopornymi prątkami, poddawanych leczeniu standardowemu, bywa nieskuteczna i może dodatkowo potęgować zjawisko lekooporności prątków *M.tb*.

Kliniczne, epidemiologiczne i ekonomiczne znaczenie gruźlicy w pełni uzasadnia intensyfikację światowych badań zmierzających do wyznaczenia nowych biomarkerów przyspieszających i udoskonalających diagnozowanie gruźlicy oraz genetycznych, komórkowych i sekrecyjnych wyznaczników reakcji obronnych, które mogą stanowić o zwiększonym ryzyku zachorowania na gruźlicę i progresji zmian chorobowych u osób zakażonych *M.tb*. Rozwój wiedzy w tym zakresie jest również niezbędny dla programowania nowych szczepionek przeciwgruźliczych, bardziej skutecznych niż szczepionka BCG, a także alternatywnych schematów terapeutycznych pozwalających leczyć gruźlicę wywołwaną przez wielolekooporne prątki *M.tb* oraz u osób z upośledzoną odpornością, włączając w to chorych na AIDS.

I.2. Cel

Pomimo wieloletnich badań chorobotwórczość prątków gruźlicy, patologia wywołwanego schorzenia oraz towarzyszące jej reakcje odpornościowe, zarówno o charakterze protekcyjnym, jak i patologicznym, pozostają słabo zrozumiałe. **Badania prowadzone w ramach przedłożonego do oceny osiągnięcia naukowego koncentrują się wokół wyjaśnienia podłoża komórkowego i molekularnego zróżnicowanego przebiegu zakażenia *Mycobacterium tuberculosis*, a także poszukiwania nowych wskaźników odpowiedzi odpornościowej o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym.**

Realizowane w badaniach cele szczegółowe obejmują:

- 1) weryfikację oryginalnej hipotezy o potencjalnym związku pomiędzy zmianami w ekspresji wybranych makrofagowych receptorów przekazywania sygnałów i leukocytarnej integryny oraz rozwojem aktywnej gruźlicy i nadwrażliwości późnej na tuberkulinę u osób, które w dzieciństwie były szczepione przeciwgruźliczą szczepionką BCG.
- 2) zbadanie czy polimorfizmy genów kodujących wybrane makrofagowe receptory, transportery jonowe i lektynę wiążącą mannozę mogą stanowić o podwyższonym ryzyku zachorowania na gruźlicę w kaukaskiej populacji polskiej.
- 3) ocenę przydatności jakościowego i ilościowego oznaczania markerów odpowiedzi adaptacyjnej na antygeny *M.tb* w diagnozowaniu pacjentów z aktywną gruźlicą płuc oraz zdrowych osób pozostających z nimi w domowym lub zawodowym kontakcie.
- 4) opracowanie uproszczonej metody wykrywania kwasów mykolewowych ściany komórkowej *M.tb* w płwocinie chorych na gruźlicę płuc.

I.3. Wybrane makrofagowe receptory przekazywania sygnałów komórkowych i leukocytna integryna jako odpornościowe biomarkery różnicujące zdrowe osoby immunizowane przeciwgruźliczą szczepionką BCG i pacjentów z aktywną gruźlicą.

Rozpoznawanie antygenów prątków przez makrofagi jest podstawowym elementem pierwszej linii obrony oraz kluczowym łącznikiem mechanizmów odporności wrodzonej z adaptacyjną. Odpowiedź odpornościowa funkcjonuje w oparciu o występowanie określonej liczby receptorów PRR (ang. *Pattern recognition receptors*) rozpoznających PAMP (ang. *Pathogen associated molecular patterns*) - konserwatywne struktury drobnoustrojów. Receptory PRR biorą udział w procesach opsonizacji i fagocytozy patogenów, indukcji procesu apoptozy, aktywacji układu komplementu oraz uruchamianiu szlaków przekazywania sygnałów komórkowych. Rodzaj wykorzystywanego przez patogeny receptora reguluje transdukcję sygnału modulującego funkcje makrofagów, utrudniając lub ułatwiając wewnątrzkomórkowe przeżywanie prątków, ale także zdolność makrofagów do prezentowania antygenów limfocytom, w środowisku aktywujących je drobnoustrojów i ich produktów. Dokładne poznanie niezwykle złożonych mechanizmów swoistej odporności na zakażenie *M.tb* obejmujących reakcje obronne i te, które decydują o patologii zmian gruźliczych, jest niezbędne dla opracowania nowych sposobów zapobiegania gruźlicy, bardziej efektywnych niż obecnie stosowana szczepionka zawierająca atenuowane prątki *M. bovis* BCG (Bacille Calmette-Guérin) [15]. Mimo upływu ponad 80 lat od pierwszego podania BCG, wzbudzana przez nią efektywność protekcyjna jest wciąż przedmiotem sporów i dyskusji. Szczepienia BCG chronią dzieci przed wczesnym zachorowaniem na gruźlicę, w tym przed najgroźniejszymi jej postaciami - gruźlicą uogólnioną (prosówką) i gruźliczym zapaleniem ośrodkowego układu nerwowego, ale ich efektywność oceniana u osób dorosłych nie przekracza średnio 50%, wahając się od 0% w Indiach i subsaharyjskiej Afryce do 80% w Wielkiej Brytanii. Parametry odpornościowe odpowiedzialne za zróżnicowaną skuteczność protekcyjną szczepionki BCG pozostają nadal niewyjaśnione. Konieczne jest również opracowanie skutecznych narzędzi pozwalających na szybką ocenę protekcyjnych właściwości aktualnie stosowanej, jak i nowo opracowywanych szczepionek, na określenie efektywności których trzeba poczekać co najmniej kilkanaście lat [23].

Podjmując powyższy problem postawiono oryginalną hipotezę o związku pomiędzy ekspresją monocytarnych receptorów przekazywania sygnałów i odpornością komórkową na szczepionkę BCG ocenianą na podstawie nadwrażliwości późnej na tuberkulinę [publikacja A6]. Jako model do tych badań wybrano grupę zdrowych młodych osób, które w wieku niemowlęcym i szkolnym zostali poddani obowiązkowemu szczepieniu BCG i którzy nigdy nie chorowali na gruźlicę. Miernikiem rozwoju swoistej odporności komórkowej była nadwrażliwość późna (DTH; ang. *Delayed type hypersensitivity*) na tuberkulinę (PPD; ang. *Purified protein derivative*) określana w skórnym teście tuberkulinowym (TST), przed pobraniem krwi do badań monocytów. Nadwrażliwość tuberkulinowa, będąca skutkiem intensywnej infiltracji skóry przez monocyty oraz limfocyty T i B, inicjowana jest

przez zlokalizowane w skórze limfocyty Th1 rozpoznające wydzielnicze białka zawarte w podawanym śródskórnym preparacie PPD. Choć w pełni nie odzwierciedla ona stanu odporności na gruźlicę jest dowodem na rozwój swoistej odporności komórkowej na produkty mykobakterii, do której dochodzi u większości osób szczepionych BCG. Ponadto, test tuberkulinowy jest obecnie jedynym testem *in vivo* pozwalającym badać reakcje na antygeny mykobakterii. W naszych wcześniejszych badaniach stwierdziliśmy, że młodzi ludzie, w wieku 18-30 lat, poddawani szczepieniom przeciwgruźliczym BCG zgodnie z kalendarzem szczepień obowiązującym w Polsce, różnią się odpowiedzią skórną na tuberkulinę. Tylko nieco ponad 60% spośród nich wykazuje dodatni test tuberkulinowy, podczas gdy pozostali pozostają tuberkulinoujemni. Zróżnicowanej odpowiedzi ochotników tuberkulinododatnich i tuberkulinoujemnych na doskórne wstrzyknięcie oczyszczonych białek tuberkulinowych PPD towarzyszyła różnica w ekspresji błonowego receptora makrofagowego mCD14. Ekspresja tego receptora była znamienne niższa na monocytach ochotników tuberkulinododatnich niż tuberkulinoujemnych, izolowanych z wykorzystaniem adherentnych właściwości tych komórek. Jednak monocyty obu grup, izolowane z użyciem magnetycznych mikrocząsteczek związanych z przeciwciałami przeciwko ludzkiemu CD14, wykazywały podobną ekspresję mCD14. Dokładna analiza wyników uwidoczniała znaczenie metodyki uzyskiwania frakcji monocytarnej krwi w ocenie właściwości badanych komórek. Pozwoliła przypuszczać, że podczas separacji magnetycznej możliwa była utrata części komórek ze słabą ekspresją mCD14. Zachęciła również do dalszych badań roli receptorów mCD14 w reakcjach odpornościowych na mykobakterie. Adherentne monocyty wykazywały nasiloną ekspresję mCD14 w środowisku PPD lub LPS *E. coli*, podczas gdy żywe prątki *M. bovis* BCG nie powodowały zmiany w ekspresji tego receptora. Podczas aktywacji monocytów/makrofagów receptor mCD14 tworzy kompleks sygnałowy z receptorem Toll-podobnym (TLR)2. W odróżnieniu od ekspresji receptora mCD14 nie zaobserwowano żadnej różnicy w ekspresji cząsteczki TLR2 na świeżo izolowanych monocytach ochotników tuberkulinododatnich i tuberkulinoujemnych [**publikacja A6**].

Komórki linii monocytarno-makrofagowej odgrywają kluczową rolę w rozwoju odporności przeciwprątkowej. Oprócz aktywności fagocytarnej i zdolności prezentowania mykobakteryjnych antygenów limfocytom T regulują one aktywność wielu populacji komórek układu odpornościowego poprzez wydzielane cytokiny. Funkcjonalna wydajność makrofagów w zwalczaniu zakażeń zależy od stopnia aktywacji tych komórek. Makrofagi nie aktywowane cechują się ograniczoną zdolnością hamowania wzrostu pochłoniętych prątków, służąc patogenom jako bezpieczna nisza życiowa. Dopiero w wyniku aktywacji, m.in. przez wydzielany przez limfocyty T interferon-gamma (IFN- γ), na skutek nasilenia syntezy enzymów lizosomalnych, rodników tlenowych i mediatorów procesu zapalnego, a także zwiększenia ekspresji cząsteczek MHC oraz licznych powierzchniowych adhezyn, makrofagi nabywają wzmożonej siły bójczej umożliwiającej im zabicie rozwijających się wewnątrzkomórkowo bakterii. Interakcje monocytów/makrofagów z prątkami inicjowane są poprzez bogaty układ powierzchniowych receptorów rozpoznających określone struktury bakteryjne. Dostępna literatura na

ten temat została poddana analizie z uwzględnieniem wyników dotychczasowych badań własnych i innych prowadzonych w Zakładzie Immunologii Komórkowej UŁ, w artykule pogładowym [publikacja A11]. Charakter makrofagowego receptora/receptorów wiążących mykobakteriowe ligandy determinuje w najwyższym stopniu uruchomienie wewnątrzkomórkowej kaskady sygnałowej regulującej rodzaj reakcji odpornościowej gospodarza i jej natężenie. Lepsze poznanie tych zależności jest kluczowe w szukaniu odpowiedzi na pytanie o molekularne wyznaczniki przeciwprątkowej odporności protekcyjnej lub przeciwnie odpowiedzi patologicznej, która prowadzi do zachorowania na gruźlicę. Kontynuując badania roli makrofagowych receptorów przekazywania sygnałów komórkowych w interakcji z prątkami skupiono swoją uwagę na błonowych i rozpuszczalnych receptorach mCD14 i sCD14, receptorze TLR2 oraz receptorze mannozowym CD206.

Receptor CD14, marker komórek linii monocytarno-makrofagowej, jest glikoproteiną o masie 53-55 kDa, związaną z błoną komórkową (mCD14, ang. *membranous CD14*) monocytów/makrofagów i w mniejszym stopniu granulocytów, oraz występującą w formie rozpuszczalnej w surowicy i płynach ustrojowych (sCD14, ang. *soluble CD14*). Częsteczka CD14 rozpoznaje lipopolisacharyd (LPS) ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych oraz jego odpowiednik u prątków – lipoarabinomannan (LAM), a także mykobakteryjne kwasy lipotejchojowe, odgrywając ważną rolę w ujawnianiu się aktywności biologicznej LAM w organizmie osób zakażonych *M.tb*. Jako receptor pozbawiony domeny transmembranowej mCD14 wchodzi w kooperację z receptorami TLR2 i TLR4, co zwiększa repertuar wiązanych ligandów. Receptory TLR2, o masie 90-100 kDa, wiążą zarówno LAM, jak i lipomannan, lipoproteinę 19 kDa oraz fosfatydyloinozytolo-mannozydy *M.tb*, wzbudzając TLR2-zależny stan aktywności makrofagów. Glikoproteina CD206 to 162-kDa receptor, występujący w formie monomerycznej na komórkach monocytów/makrofagów, wchodzący w interakcje z komponentami cukrowymi zawierającymi reszty mannozy, fukozy i N-acetyloglukozaminy, a także pośredniczący w przekazywaniu LAM do przedziałów endocytarnych zawierających cząsteczki CD1b i prezentowaniu kwasów mykolowych i lipoglikanów limfocytom T γ/δ . Połączenie receptorów PRR z ligandem wyzwała wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałową przebiegającą z udziałem molekuł adaptorowych MyD88 (ang. *Myeloid differentiation factor 88*) i TRIF (ang. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), aktywujących jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B (ang. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), prowadzącą do indukcji produkcji prozapalnych cytokin (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12). Uwalniana przez makrofagi IL-12 promuje rozwój i różnicowanie się limfocytów pomocniczych CD4(+) Th1, produkujących IFN- γ i IL-2, dwie kluczowe cytokiny dla rozwoju adaptacyjnej komórkowej odpowiedzi odpornościowej na antygeny prątków, a także nadwrażliwości późnej na tuberkulinę wydzielaną przez mykobakterie. Ostatecznie efektem końcowym, zapoczątkowanego przez PRR szlaku sygnalizacyjnego jest mobilizacja komórkowych mechanizmów odporności wrodzonej i nabytej do walki z chorobotwórczymi prątkami. W procesie tym istotną rolę należy przypisać adhezynie LFA-1 (ang. *Lymphocyte function-associated antigen 1*; CD11a/CD18), która reguluje migrację leukocytów do ognisk zapalnych i infekcyjnych, oraz międzykomórkowe

interakcje, w tym interakcje aktywowanych makrofagów prezentujących antygeny limfocytom. **Typując receptory mCD14, sCD14, TLR2, CD206 i adhezyny LFA-1 jako molekularne tarcze podjęto próbę określenia wskaźników charakteryzujących stan załamania odporności przeciwprątkowej, który może sprzyjać reaktywacji latentnego zakażenia *M.tb* w aktywnej gruźlicę [publikacja A3].** Badania porównawczymi objęto dużą grupę 224 osób charakteryzowaną pod względem klinicznym oraz ekspozycji na zakażenie *M.tb*. W badaniach uwzględniono dwie grupy pacjentów sklasyfikowanych na podstawie badań klinicznych prowadzonych przez współpracujących pulmonologów i wyników trzykrotnie powtarzanego badania płwociny metodą hodowli. Jedną grupę stanowili pacjenci z aktywnej gruźlicą płuc (TB) i dodatnią hodowlą *M.tb*. Grupą odniesienia była grupa pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrej nieprątkowej infekcji płuc (NMLD, ang. *nonmycobacterial lung diseases*), w płwocinie których nie wykryto *M.tb*. W celu określenia wytypowanych parametrów odpornościowych w stanie latentnego zakażenia *M.tb*, badaniami objęto dwie grupy zdrowych ochotników, którzy nigdy nie chorowali na TB, ale pozostawali w zawodowym (kontakty zawodowe) lub domowym (kontakty rodzinne) kontakcie z chorymi na aktywnej TB. Grupą kontrolną była grupa osób zdrowych, którzy nie wykazywali w wywiadzie kontaktu z chorującymi na TB. Analiza wyników wykazała znamienne nasilenie ekspresji mCD14 na monocytach wyłącznie pacjentów z TB. Zgodnie z wcześniejszym przypuszczeniem, zaobserwowano fenotypowe zróżnicowanie monocytów pod względem ekspresji mCD14. Nasiloną ekspresję mCD14 w grupie TB potwierdził znamienne zawyżony średni odsetek monocytów o fenotypem CD14^{high} z silną ekspresją receptora mCD14, o wartości przewyższającej medianę powierzchniowej ekspresji mCD14 wyliczoną dla wszystkich ochotników objętych badaniami. Zwiększonej ekspresji mCD14 na monocytach pacjentów z TB towarzyszyło nasilenie ekspresji adhezyny LFA-1, które stwierdzono również w grupie chorych z NMLD, jednak bez współwystępowania nadekspresji receptora mCD14. W kontrolnej grupie osób zdrowych wykazano znamienne niższą monocytarną ekspresję mCD14 niż w grupie TB oraz znamienne niższą niż w grupach TB i NMLD ekspresję integryny LFA-1. **Udokumentowany, jednoczesny wzrost ekspresji receptora mCD14 i LFA-1 na komórkach monocytarnych krwi obwodowej pacjentów z TB jest pośrednim dowodem zaangażowania tych molekuł w reakcje odpornościowe na zakażające wirulentne prątki *M.tb*.** Towarzysząca wzmożonej ekspresji CD14 nasiloną ekspresją LFA-1 może sprzyjać migracji komórek prezentujących prątkowe ligandy do ognisk infekcyjnych oraz ułatwiać im kontakt z efektorowymi limfocytami T. Biorąc pod uwagę doniesienia, w których wykazano, że ludzkie prekursorowe komórki dendrytyczne z ekspresją CD14 wykazują silniejszą ekspresję integryny CD11b i nasiloną adhezję do ścian naczyń i innych leukocytów niż komórki dendrytyczne nie posiadające CD14, stwierdzona w badaniach nadekspresja mCD14 i LFA-1 może odgrywać kluczowe znaczenie w migracji tych komórek do tkanek objętych zakażeniem gruźliczym. Rekrutowane monocyty wykazując nasiloną ekspresję mCD14 mogą intensywniej odpowiadać na różne sygnały aktywacji. Takim sygnałem może być wstrzyknięcie do skóry PPD. Podczas diagnozowania pacjentów z TB wykonano u nich test tuberkulinowy. Stwierdzono, że

nadwrażliwość późna na tuberkulinę czyli występowanie stwardnienia skóry o średnicy nie mniejszej niż 10 mm obserwowano średnio u około 60% pacjentów z aktywną gruźlicą płuc, a odsetek ten znacząco malał wraz z ich wiekiem [publikacja A3]. Brak skórnej reaktywności na tuberkulinę u pacjentów z TB często tłumaczy się immunosupresyjnym działaniem wirulentnych *M.tb*. Jednak obserwowany przez nas malejący odsetek dodatnich testów tuberkulinowych w grupie najstarszych pacjentów z TB pozwala na rozważenie innej interpretacji uzyskiwanych wyników. Spadek reaktywności skórnej na PPD można prawdopodobnie również tłumaczyć stopniowym obniżaniem się zdolności rozwijania swoistych reakcji komórkowych towarzyszącej procesowi starzenia się organizmu. Warto wspomnieć, że większość pacjentów z TB objęta tymi badaniami przeszła szczepienia BCG w dzieciństwie i wieku szkolnym, gdyż szczepienia takie są obowiązkowe w Polsce od lat 50-tych XX wieku. Biorąc ten fakt pod uwagę można by przypuszczać, że wyższy odsetek tuberkulinoujemnych pacjentów w starszych grupach wiekowych w porównaniu do młodszych chorych spowodowany był osłabieniem pamięci immunologicznej, co pozostaje w zgodzie ze zawiżoną podatnością na TB osób starszych. Z drugiej strony warto wspomnieć, że podobny, jak wśród pacjentów z gruźlicą, odsetek ujemnych odczynów tuberkulinowych (40%) obserwowano w grupie zdrowych młodych osób szczepionych, nawet kilkakrotnie, przeciwgruźliczą szczepionką BCG [publikacja A6]. To zasugerowało możliwość genetycznego uwarunkowania rozwoju nadwrażliwości typu późnego na tuberkulinę, którą oceniono w pracach Strapagiel i wsp., 2008 [publikacja A6] i Druszczyńska i wsp., 2009 [publikacja A5]. Ten profil badań scharakteryzowano w następnym podrozdziale. **W tym miejscu należy podkreślić znaczenie zaobserwowanego współwystępowania nasiloniej ekspresji błonowej postaci receptora mCD14 z nadekspresją integryny LFA-1 na monocytach chorych z TB, jako możliwego, nowego biomarkera odpornościowego aktywnej gruźlicy o potencjalnej wartości aplikacyjnej w szybkim diagnozowaniu pacjentów, szczególnie tych, u których żadną dostępną laboratoryjną metodą diagnostyczną nie udaje się potwierdzić zakażenia *M.tb* [publikacja A3].**

Receptor CD14 występuje w organizmie zarówno w formie związanej z błoną komórkową, jak i w postaci rozpuszczalnej w surowicy i płynach ustrojowych (sCD14). Równoległe z analizą cytometryczną błonowej ekspresji receptora mCD14 oceniono immunoenzymatycznie poziom rozpuszczalnej formy tego receptora w surowicach osób chorujących na gruźlicę, chorych z nieprątkową infekcją płuc oraz zdrowych ochotników. O ile nasiloną ekspresję mCD14 obserwowano tylko u pacjentów z aktywną TB, to znamienne podwyższenie poziomu surowiczego sCD14 stwierdzono zarówno w grupie chorych z TB, jak i pacjentów chorujących na zapalenie płuc o etiologii innej niż prątkowa (NMLD). W grupach tych stwierdzono znamienne wyższy odsetek osób wyróżniających się wysokim poziomem sCD14, przewyższającym wartość mediany wyznaczonej dla wszystkich grup objętych badaniami [publikacja A3]. Obserwacja taka pozostaje w zgodzie z klasyfikowaniem cząsteczki sCD14 jako białka ostrej fazy, zdolnego osłabiać aktywację i funkcje ludzkich limfocytów T [29]. Podwyższony poziom sCD14 w surowicach obserwowano również u chorych na gruźlicę

mieszkańców Kolumbii i Meksyku, a wyniki niektórych badań wskazywały na pozytywną korelację pomiędzy wysokim stężeniem surowiczego sCD14 i zaostrzeniem zmian gruźliczych [33, 34]. Niektóre doniesienia wskazały, że podwyższone surowicze stężenie sCD14 obserwowane w ostrym stadium choroby ulega stopniowemu obniżeniu w miarę trwającego leczenia przeciwprątkowego [33]. W badaniach własnych nie stwierdzono, by poziom sCD14 korelował ze stopniem zaawansowania zmian gruźliczych w płucach. Rozważając przydatność uwzględnienia sCD14 jako biomarkera TB należy pamiętać, że poziom tego białka w surowicy wzrasta znacząco w niektórych chorobach zakaźnych i niezakaźnych, np. w brucelozie, chlamydiozach, infekcjach gronkowcowych, ale także w chorobie Crohn'a lub toczniu rumieniowatym układowym [3, 13, 17, 19, 36]. Sugeruje się, że podwyższony poziom sCD14 w chorobach zapalnych jest prawdopodobnie skutkiem aktywacji monocytów/makrofagów prowadzącej do nasilonego „zrzucania” (ang. *shedding*) związanych z powierzchnią komórek receptorów mCD14, odzwierciedlając potrzebę usuwania z krążenia takich stymulatorów zapalenia jak LAM prątków, czy też inne antygeny chorobotwórczych bakterii [12]. Źródłem sCD14 mogą być również komórki śródbłonna lub hepatocyty odpowiadające na czynniki infekcyjne nasiloną produkcją sCD14, czym można tłumaczyć obserwowany w grupie z ostrą nieprątkową infekcją płuc podwyższony surowiczy poziom rozpuszczalnego CD14 bez towarzyszącej mu wzmożonej ekspresji formy błonowej tego białka (mCD14), którą obserwowano tylko na monocytach chorych z aktywną gruźlicą. Uwzględnienie w naszych badaniach obu grup chorych z TB i NMLD, zaleca ostrożność w wykorzystywaniu podwyższonego stężenia sCD14, jako wskaźnika aktywnego procesu gruźliczego. Jednak parametr taki może stanowić element pomocniczy w identyfikowaniu pacjentów z TB, u których stwierdza się nadekspresję monocytarnych mCD14 i LFA-1 [publikacja A3]. Efekt działania makrofagów w zakażeniach mykobakteryjnych determinowany jest stanem ich aktywacji, nabywanej w wyniku kaskadowej reakcji sygnałowej inicjowanej między innymi przez interakcję receptorów mCD14 z heterodimerami TLR2/TLR1. Jednak nadekspresji monocytarnego mCD14 u pacjentów z TB nie towarzyszył wzrost ekspresji TLR2, która pozostawała na poziomie podobnym do stwierdzanej w grupie pacjentów z NMLD i zdrowych ochotników. Podobnie ekspresja mannozowego receptora CD206, dyskusowanego w kontekście przenikania prątków gruźlicy do makrofagów, była podobna na monocytach pacjentów z TB, NMLD i zdrowych ochotników. **Przeprowadzone badania pozwoliły konkludować, że załamanie odporności przeciwprątkowej sprzyjającej reaktywacji latentnego zakażenia *M.tb* do aktywnej gruźlicy może przynajmniej w części być spowodowane nadreaktywnością prozapalną makrofagów wyrażającą się niezależną od TLR2 nadekspresją receptorów mCD14 i sCD14 oraz integryny LFA-1 regulującej międzykomórkowe interakcje leukocytów oraz ich wewnątrzustrojową migrację [publikacja A3].**

W celu dalszego uwiarygodnienia wykazanej nadekspresji receptorów mCD14 i sCD14 oraz nadprodukcji integryny LFA-1 jako wskaźników aktywnej gruźlicy, do badań włączono ochotników zdrowych z podwyższoną ekspozycją na prątki gruźlicy, pozostających w zawodowym lub rodzinnym kontakcie z chorującymi na gruźlicę. **Umożliwiło to zbadanie czy wytypowane wskaźniki mogą**

odnosić się do stanu latentnego zakażenia *M.tb*. Stan zakażenia prątkami *M.tb* identyfikowano na podstawie wyniku testu interferonowego QuantiFERON®-TB Gold In Tube (Cellestis Limited, Australia). Wykonanie tego testu u eksponowanych na prątki gruźlicy zdrowych osób z kontaktu z TB wykazało występowanie LTBI u wysokiego odsetka ochotników, 44% i 27%, odpowiednio z zawodową i domową ekspozycją na prątki, znacznie przekraczającego wartości uzyskiwane dla osób nie zgłaszających kontaktu z chorymi na TB, zdrowych (13%) lub z NMLD (14%). **Analiza wyników obrazujących ekspresję receptorów mCD14, LFA-1 i TLR2 na monocytach oraz stężenie sCD14 w surowicach zdrowych osób z utajonym zakażeniem prątkami gruźlicy oraz bez takiej infekcji nie wykazała znamienych międzygrupowych różnic. To wzmocniło naszą opinię o tym, że jednoczesna nadekspresja monocytarnych receptorów mCD14, LFA-1 oraz surowiczego sCD14 określa stan załamania odporności przeciwprątkowej u chorych z aktywną gruźlicą i może mieć wartość diagnostyczną w wykrywaniu TB oraz monitorowaniu osób z latentnym zakażeniem gruźliczym zagrożonych rozwojem aktywnej postaci tej choroby [publikacja A3].** O ile nie stwierdziliśmy różnicy w ekspresji monocytarnego LFA-1 w grupach zdrowych kontaktów zawodowych lub rodzinnych, z i bez latentnego zakażenia *M.tb*, to średnia ekspresja tej integryny na monocytach zdrowych osób pozostających w kontaktach z pacjentami z aktywną TB była znamienne wyższa niż ekspresja LFA-1 na monocytach zdrowych osób spoza kontaktów z TB. Konfrontując ten wynik z wcześniej diskutowaną nadekspresją LFA-1 na monocytach pacjentów z ostrą nieprątkową infekcją płuc można przypuszczać, że nadekspresja integryny na monocytach zawodowych i rodzinnych kontaktów z TB była wywołana zawyżoną ekspozycją na zakażenie *M.tb*. Ten problem podjęto w późniejszej pracy diskutowanej poniżej [publikacja A1].

Wyniki uzyskane w zakresie badań dotyczących ekspresji wybranych molekuł na komórkach zdrowych osób immunizowanych przeciwgruźliczą szczepionką BCG i pacjentów z aktywną gruźlicą zaprezentowano również w postaci doniesień plakatowych i ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych [doniesienia 19, 22, 24, 25, 26, 29, 49, 55].

Za najważniejsze wyniki zrealizowanych w tej części badań należy uznać:

- 1) wykazanie, że załamanie odporności przeciwprątkowej sprzyjającej reaktywacji latentnego zakażenia *M.tb* do aktywnej gruźlicy może przynajmniej w części być spowodowane nadreaktywnością prozapalną makrofagów wyrażającą się niezależną od TLR2 nadekspresją błonowych (mCD14) i rozpuszczalnych (sCD14) receptorów przekazywania sygnałów komórkowych oraz integryny LFA-1 regulującej międzykomórkowe interakcje leukocytów oraz ich wewnątrzustrojową migrację,
- 2) wskazanie jednoczesnej ekspresji błonowego receptora mCD14 i adhezyny LFA-1 na monocytach krwi obwodowej jako nowego odpornościowego biomarkera aktywnej gruźlicy o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym w diagnozowaniu pacjentów, w tym tych ze skąpoprątkową postacią tej choroby,

- 3) wykazanie znaczenia metody zagęszczania zawiesiny leukocytów krwi obwodowej w monocyty dla ekspresji makrofagowego receptora mCD14,
- 4) postulowanie możliwej roli błonowego receptora mCD14 w rozwoju nadwrażliwości późnej na tuberkulinę, niezależnej od interakcji makrofagów z żywymi prątkami *M. bovis* BCG

I.4. Genetyczne wyznaczniki statusu odpornościowego u chorych na gruźlicę i zdrowych osób poddawanych przeciwgruźliczym szczepieniom BCG

Analiza danych epidemiologicznych wskazująca na populacyjne zróżnicowanie podatności na gruźlicę stała się impulsem do podjęcia badań związanych z wyznaczeniem molekularnych parametrów osobniczej podatności na chorobotwórcze działanie prątków gruźlicy. Statystyki WHO jednoznacznie dowodzą, że spośród około 1/3 zakażonych prątkami *M.tb* ludzi na świecie na gruźlicę zapada nie więcej niż 5-10% tej populacji [23]. Pewien odsetek ludzi poddanych ekspozycji na *M.tb*, pozostaje wolny od zakażenia, głównie dzięki wysokiej efektywności mechanizmów odporności wrodzonej [9, 26]. U przeważającej większości osób przechodzących pierwotną infekcję *M.tb*, mechanizmy te są niewystarczające i wymagają wsparcia przez reakcje komórkowej odpowiedzi adaptacyjnej. Wykształcona odpowiedź komórkowa oparta o współdziałanie zaktywowanych makrofagów, wyspecjalizowanych klonów limfocytów T, komórek NK oraz wydzielanych przez nie cytokin powstrzymuje rozwój *M.tb*, ale nie gwarantuje całkowitej eliminacji prątków z ustroju. U niskiego odsetka (<10%) osób zakażonych *M.tb* pierwotna infekcja przechodzi natychmiast lub w ciągu pierwszych dwóch lat od zakażenia w gruźlicę aktywną. Status immunologiczny pozostałych (90%) zakażonych osób zapewnia protekcję przeciwgruźliczą ustanawiając stan uśpionego zakażenia *M.tb*, które u około 5-10% osób może rozwinąć się w aktywną gruźlicę na skutek osłabienia mechanizmów odporności protekcyjnej i rozwoju reakcji patologicznych [7]. Wobec niezwyklej złożoności reakcji odpornościowych wzbudzanych przez prątki gruźlicy zrozumiaille wydaje się, że w zróżnicowany przebieg zakażenia tymi bakteriami mogą być zaangażowane liczne geny, wśród których kluczową rolę odgrywają te, których produkty regulują interakcje *M.tb* z komórkami układu odpornościowego. Do takich należą cząsteczki warunkujące aktywność biologiczną makrofagów i limfocytów T, w tym receptory PRR, cytokiny lub wiążące je receptory, rozpuszczalne lub transmembranowe lektyny typu C, białkowe transportery jonowe czy cząsteczki układu MHC, które przedstawiono w artykule przeglądowym [publikacja A8].

Po powrocie ze stażu naukowego w Department of Medical Microbiology Uniwersytetu w Oulu (Finlandia) w zespole badawczym dr Riitty Karttunen (październik/listopad 2003r) rozwinęłam nowy kierunek badań nad polimorfizmem genów istotnych w odporności przeciwzakaźnej oceniając występowanie zależności pomiędzy zachorowalnością na gruźlicę w populacji polskiej kaukaskiej a polimorfizmami typu SNP (ang. *Single nucleotide polymorphism*) genów kodujących: makrofagowe receptory CD14 (*cd14/-159C/T*), TLR2 (*R677W, R753Q*), TLR4 (*D299G, T399I*), surowiczą lektynę

wiążącą mannozę – MBL (ang. *Mannose binding lectin*; kodony 52, 54, 57) oraz białko transportowe fagosomów SLC11A1 (ang. *Solute carrier protein 11 member 1*; INT4-469G/C). Monocytno-makrofagowy receptor CD14 kodowany jest przez gen *cd14* zlokalizowany na chromosomie 5 (5q31.1). U ludzi dość często notuje się występowanie polimorfizmu tego genu w pozycji -159 od miejsca startu transkrypcji, umiejscowionym w regionie promotora bogatym w pary GC [24]. Mutacja punktowa polegająca na zamianie C na T (*cd14*/-159C/T; rs2569190) może prowadzić do zmian w aktywności transkrypcyjnej genu *cd14* na skutek interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi Sp1-Sp4 [4, 41]. Zdaniem wielu badaczy regulacja transkrypcji alleli genu *cd14* związana jest ze zmianami w efektywności interakcji DNA/białko i wzajemnym stosunku czynników transkrypcyjnych Sp - (Sp3):(Sp1 + Sp2)]. Jak wykazano, aktywność transkrypcyjna allelu T była nasiloną w komórkach linii monocytarnej z niską ekspresją czynnika transkrypcyjnego Sp3 [41]. Analiza polimorfizmu genu *cd14*/-159C/T wykazała, że mutacja ta jest bardzo rozpowszechniona w polskiej populacji kaukaskiej [publikacja A7]. Nosicielstwo zmutowanej wersji genu, bądź to w formie heterozygotycznej C/T, bądź w formie homozygotycznej T/T obserwowano u 61% pacjentów chorujących na gruźlicę i 69% zdrowych ochotników. Częstość ta pozostaje w zgodzie z innymi doniesieniami, w których warianty z mutacją regionu promotora genu *cd14* w pozycji -159 C/T stwierdzono u około 70% ludzi rasy białej [4, 33]. **Przeprowadzone badania nie wykazały występowania zależności między polimorfizmem *cd14*/-159C/T i zachorowalnością na TB.** Podobnie nie stwierdzono zależności pomiędzy tym polimorfizmem i zawyżoną koncentracją rozpuszczalnego receptora sCD14 stwierdzaną u chorych z aktywną gruźlicą [publikacja A5]. Związku polimorfizmu *cd14*/-159C/T ze stężeniem sCD14 w surowicy oraz ekspresją mCD14 na świeżo izolowanych monocytach krwi obwodowej nie obserwowano również w badaniach prowadzonych młodych, zdrowych, szczepionych BCG ochotników [publikacja A6]. Obserwacje te pozostają w zgodzie z wynikami innych autorów, w których również nie potwierdzono występowania takiej zależności [17, 33, 34], z drugiej jednak strony są w sprzeczności z doniesieniami, w których polimorfizm *cd14*/-159C/T był związany z silniejszą transkrypcją tego genu badanego na poziomie mRNA [24, 25], warunkującą wyższe stężenie sCD14 w surowicy [4, 21, 22].

Poszukując kandydata genu pozostającego w korelacji z zachorowaniem na TB zbadano polimorfizm INT4-469G/C genu *slc11a1* (rs 3731865), będący homologiem genu *nramp-1* (ang. *natural resistance associated macrophage protein-1*) warunkującego odporność myszy na zakażenie *Salmonella typhimurium*, *Leishmania donovani* i *M. bovis* BCG [30]. Białko SLC11A1, kodowane przez gen na chromosomie 2 (2q35), pełni rolę pompy jonowej transportującej jony żelaza do wnętrza komórek fagosomów. Związek pomiędzy podatnością na gruźlicę a zmiennością tego genu stwierdzono w badaniach kanadyjskich aborygenów, mieszkańców Gambii i Brazylii, natomiast prace prowadzone w Danii nie potwierdziły występowania takiej zależności [6, 16, 39]. **W badanej kaukaskiej populacji polskiej dystrybucja poszczególnych genotypów i alleli wśród chorujących na TB i osób zdrowych była niemal identyczna, co wskazało na brak wpływu polimorfizmu INT4-469G/C genu *slc11a1* na podatność na gruźlicę [publikacja A7]**

Biorąc pod uwagę dane literaturowe wskazujące na możliwy związek pomiędzy podatnością na gruźlicę a zmiennością genów kodujących, rozpoznające liczne ligandy prątkowe, receptory Toll-podobne, TLR2, TLR4, w badaniach oceniono częstość występowania mutacji w dwóch pozycjach genu *tlr2* - *R677W* (rs5743708) i *R753Q* (rs121917864) oraz *tlr4* - *D299G* (rs4986790) i *T399I* (rs4986791) prowadzących do zmiany sekwencji aminokwasowej kodowanych białek [**publikacja A5**]. **Uzyskane wyniki nie wykazały znamiennej roli polimorfizmów genów TLR2 i TLR4 w patogenezie gruźlicy w badanej kaukaskiej populacji Polaków.** Mutacje *D299G*, *T399I* oraz *R753Q* obserwowano zaledwie u około 11% osób, niezależnie od grupy poddawanej analizie. Wśród objętych badaniami osób nie wykazano występowania mutacji *R677W*, co pozostaje w zgodzie z danymi wskazującymi, że mutacja ta nie jest spotykana u osób z rasy białej [42].

Analizując dystrybucję genu *mbl-2*, kodującego surowiczą opsoninę wiążącą mannozę -MBL, stwierdzono znaczne, prawie 40%, rozpowszechnienie wariantów allelicznych B (kodon 54,rs1800450), C (kodon 57; rs1800451) i D (kodon 52,rs5030737) w badanej polskiej populacji kaukaskiej [**publikacja A7**]. **W badaniach nie wykazano wpływu wariantów *mbl-2* na podatność na zachorowanie na gruźlicę, ale potwierdzono opisywany w literaturze znaczący spadek zawartości tego białka w surowicach nosicieli mutacji.** Jednocześnie zaobserwowano znamienne podwyższonego poziomu MBL u chorych na gruźlicę z każdym wariantem allelicznym genu *mbl-2* w porównaniu do poziomu tej lektyny w surowicach grupy kontrolnej. Rozpatrując makrofagi jako niszę życiową *M.tb* można sądzić, że wzrost zawartości MBL obserwowany w gruźlicy może być, przynajmniej teoretycznie, korzystny dla bakterii, bowiem lektyna ta wiążąc się poprzez receptor mannozowy może ułatwiać im kontakt i wnikanie do makrofagów. Sugestia ta pozostaje jednak w sprzeczności z obserwowanym brakiem zależności pomiędzy mutacjami genu *mbl-2*, prowadzącymi do znamiennego obniżenia surowiczego poziomu MBL, i podatnością na gruźlicę. Osobnicze zróżnicowanie surowiczego poziomu MBL uniemożliwia wykorzystanie wzrostu stężenia tej lektyny jako markera aktywnej gruźlicy.

Jak wykazały uzyskane wyniki, żaden z wytypowanych polimorfizmów genetycznych nie pozostawał w związku ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na gruźlicę w kaukaskiej populacji polskiej, nie stwierdzono bowiem żadnych międzygrupowych różnic w dystrybucji poszczególnych alleli i genotypów. Takie dane z jednej strony zyskują potwierdzenie w wynikach wielu badaczy [1, 8, 27, 33, 43], z drugiej jednak strony kontrastują z doniesieniami wskazującymi na udział wymienionych mutacji w kształtowaniu zwiększonej podatności na zakażenie *M.tb* [5, 14, 31, 34]. Sprzeczne wyniki dotyczące roli poszczególnych genów w determinowaniu zachorowalności na gruźlicę można tłumaczyć populacyjnym i rasowym zróżnicowaniem podatności na chorobotwórcze działanie prątków, różnym narażeniem osobniczym na kontakt z *M.tb* i/lub prątkami środowiskowymi, a także odmienną wirulencją lokalnie występujących wirulentnych szczepów prątków.

Zrozumienie zróżnicowanej podatności ludzi na chorobotwórcze działanie prątków gruźlicy może ułatwić poznanie determinantów odpowiedzi komórkowej na atenuowane prątki *M. bovis* BCG stosowane w obowiązkowych szczepieniach przeciwgruźliczych. Jak już wcześniej wspomniano,

nadwrażliwość późną na PPD wykazywało tylko około 60% szczepionych profilaktycznie szczepionką BCG zdrowych młodych osób nigdy nie chorujących na gruźlicę, co sugeruje genetyczne podłoże rozwoju takiej reakcji. **W kontekście tuberkulinowej nadwrażliwości typu późnego zbadano polimorfizm genów zaangażowanych w regulację aktywności prątkobójczej makrofagów kodujących receptory TLR2 (*R677W*, *R753Q*) oraz TLR4 (*D299G*, *T399I*), nie wykazując żadnych znamienych różnic w dystrybucji polimorfizmów genów kodujących te cząsteczki wśród osób z dodatnim i ujemnym odczynem tuberkulinowym [publikacja A6].** Mutacje w zakresie polimorfizmów *D299G* oraz *T399I* obserwowano u 13% osób tuberkulinoujemnych i 5% tuberkulinododatnich, natomiast nosicielami mutacji *R753Q* było odpowiednio 3% i 6% ochotników z ujemną i dodatnią reakcją na PPD. Podobnie jak w grupie osób badanej w kontekście zachorowalności na gruźlicę, żaden z badanych ochotników nie posiadał mutacji w genie *R677W*.

Wyniki w zakresie badania genetycznego uwarunkowania zachorowalności na gruźlicę zaprezentowano w postaci doniesień plakatowych i ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych [doniesienia 12, 13, 18, 21, 36, 38, 44, 46, 48, 54, 56, 59].

Za najważniejsze wyniki zrealizowanych w tej części badań należy uznać:

- 1) wskazanie, że badane polimorfizmy genów kodujących makrofagowe receptory CD14 (*cd14/-159C/T*), TLR2 (*Arg677Trp*, *Arg753Gln*) i TLR4 (*Asp299Gly*, *Thr399Ile*), a także genu *slc11a1* (*INT4-469G/C*) oraz *mbl-2* (kodony 52, 54, 57) nie mogą być uznane za wyznaczniki podwyższonego ryzyka zachorowania na gruźlicę w kaukaskiej populacji polskiej
- 2) wykazanie braku różnicy w dystrybucji polimorfizmów genów kodujących makrofagowe receptory TLR2 i TLR4 w grupach tuberkulinoujemnych i tuberkulinododatnich ochotników, immunizowanych w dzieciństwie szczepionką BCG.

I.5. Przydatność jakościowego i ilościowego oznaczania markerów odpowiedzi adaptacyjnej na antygeny *M. tuberculosis* w diagnozowaniu pacjentów z aktywną gruźlicą płuc oraz zdrowych osób z pozostających z nimi w domowym lub zawodowym kontakcie

Interakcja *M.tb* z układem odpornościowym człowieka jest procesem złożonym, obejmującym kaskadowe reakcje zachodzące w prątkach oraz w komórkach i tkankach gospodarza. Przebieg tych interakcji determinuje, czy ustali się stan równowagi pomiędzy prątkami i układem obronnym człowieka, w którym osłabione metabolicznie bakterie wywołają tylko stan latentnej infekcji gruźliczej, czy wprost przeciwnie mało wydajne mechanizmy obronne gospodarza pozwolą na aktywację metabolizmu prątków i ich rozwój prowadzący do destrukcji tkanek charakteryzujący aktywną gruźlicę. Pierwotne zakażenie prątkami *M.tb* następuje zazwyczaj na drodze inhalacyjnej. Bakterie znajdujące się w drobnych kroplach aerozolu wydzielanego przez prątkujących chorych wnikają do układu oddechowego i po ominięciu nabłonka rzęskowego przedostają się do dolnych dróg oddechowych. Tam, w pęcherzykach płucnych, wychwytywane są przez makrofagi alweolarne, które u większości ulegających pierwotnemu zakażeniu osób nie są wystarczająco aktywne, aby wytrzebić zakażające

prątki. Żywe, wirulentne bakterie namnażają się wewnątrz komórek makrofagów, które stają się dla nich niszą życiową umożliwiając im unikanie mechanizmów humoralnych wrodzonej odporności nieswoistej [35]. W 2-3 tygodniu od zakażenia następuje rozwój swoistej odporności komórkowej nabytej, podczas której grasiczozależne limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ różnicują się w komórki T efektorowe, które rozpoznają antygeny mykobakterii prezentowane przez komórki dendrytyczne w kontekście antygenów głównego układu zgodności tkankowej MHC (ang. *major histocompatibility complex*), odpowiednio klasy II i I. Efektem tego pobudzenia jest wydzielanie przez limfocyty IFN- γ , cytokiny, która, prowadząc do wzmożonej produkcji aktywnych form tlenu ROI (ang. *Reactive oxygen intermediates*) i azotu RNI (ang. *Reactive nitrogen intermediates*), nasila aktywność prątkobójczą makrofagów [35]. Makrofagi zaktywowane przez IFN- γ , współdziałający z produkowanym czynnikiem martwicy nowotworów TNF- α (ang. *tumor necrosis factor-alpha*), stają się zdolne do zabicia i strawienia pochłoniętych prątków i powstrzymania rozwijającej się infekcji. Z długotrwałym przeżywaniem prątków w makrofagach cechujących się słabą siłą bójczą i nieustanną stymulacją komórek odpornościowych antygenami rozwijających się bakterii wiąże się rozwój ziarniny gruźliczej (łac. *granuloma*), ograniczającej ognisko zapalne od zdrowej tkanki. Nadmierne nasilenie wzbudzonej przez antygeny mykobakterii lokalnej odpowiedzi zapalnej może prowadzić do powstawania ognisk martwiczych w postaci jam i ubytków w tkance płucnej. Skuteczne powstrzymywanie rozwoju infekcji przez mechanizmy odporności komórkowej doprowadza do powolnego wygasania, otoczonego przez wysyceny jonami wapnia wał tkanki łącznej, ogniska gruźliczego, w którym wirulentne komórki prątków przebywają latami w stanie zredukowanego metabolizmu. Taki stan równowagi pomiędzy ulegającymi latencji prątkami a odpornością makroorganizmu utrzymuje się u 90-95% zakażonych. U pozostałych 5-10% dochodzi do reaktywacji uśpionego zakażenia i rozwoju aktywnej gruźlicy, przy czym częstość tego procesu wzrasta wraz z wiekiem oraz na skutek wystąpienia immunosupresji. W puli krążących limfocytów T osób z latentnym zakażeniem *M.tb* znajdują się limfocyty pamięci, które rozpoznają mykobakteryjne antygeny – CFP-10 (ang. *Culture filtrate protein-10*), ESAT-6 (ang. *Early secreted antigenic target-6*) oraz TB 7.7 (p4), odpowiadając natychmiastową produkcją cytokin, w tym IFN- γ . Antygeny CFP-10 i ESAT-6 *M.tb*, kodowane przez, utracony przez atenuowany szczep *M. bovis* BCG, region różnicowania RD1 (ang. *Region of difference 1*), pozwalają różnicować odpowiedź cytokinową na prątki szczepionkowe i wirulentne. Zdolność produkcji tej cytokiny wykorzystywana jest w diagnostycznych testach interferonowych *in vitro* zwanych IGRA (ang. *Interferon-gamma release assay*), zaaprobowanych do diagnostyki aktywnych i latentnych infekcji *M.tb*. Na rynku dostępne są dwa komercyjne zestawy IGRA – QuantiFERON® Gold In Tube (Cellestis Limited, Australia) oraz T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Anglia), różniące się techniką wykonania. W pierwszym z nich poziom IFN- γ mierzony jest immunoenzymatycznie, drugi zestaw to test typu ELISpot oceniający liczbę limfocytów odpowiadających produkującej tej cytokiny [publikacja A10].

Weryfikację przydatności testu interferonowego QuantiFERON® Gold In Tube jako narzędzia wspomagającego diagnozowanie aktywnej gruźlicy w badaniach własnych wykonano w grupie 80 pacjentów z czynną gruźlicą płuc, w tym u chorych, w płwocinie których wykryto obecność prątków gruźlicy, oraz u takich u których klasycznymi metodami mikrobiologicznymi nie udało się wykryć prątków gruźlicy, którzy zostali zdiagnozowani wyłącznie na podstawie objawów, obrazu rentgenowskiego płuc oraz efektów terapii przeciwprątkowej [**publikacja A2**]. Oprócz standardowej diagnostyki mikrobiologicznej u wszystkich pacjentów wykonano również skórny test tuberkulinowy (TST), oceniający rozwój nadwrażliwości typu późnego na PPD. Uzyskane w badaniach wyniki poddano analizie jakościowej zgodnie z instrukcją zestawu załączoną przez producenta, oraz dodatkowo analizie ilościowej, wykorzystując metodę krzywej ROC do wyznaczenia wartości cut-off testu. Zarówno wśród chorych z TB potwierdzoną, jak i niepotwierdzoną bakteriologicznie stwierdzono podobny odsetek (około 40%) negatywnych wyników testu interferonowego i tuberkulinowego, który, w przypadku testu tuberkulinowego, znacząco wzrastał wraz z wiekiem badanych chorych. Zaobserwowaną anergię można tłumaczyć obniżonym odsetkiem, zdolnych do produkcji IFN- γ , uczulonych limfocytów T we krwi obwodowej, które migrują do miejsca toczącego się w płucach procesu zapalnego. Podobny w obu grupach był również średni poziom tej cytokiny wykrywany w hodowlach pełnej krwi stymulowanej specyficznymi antygenami *M.tb*. Zgodność obu testów, IGRA i TST, ocenioną na podstawie współczynnika kappa jako dobrą, wykazano u ponad 70% badanych chorych. **Wyniki takie wskazują na zawodność testu IGRA w wykrywaniu aktywnego zakażenia *M.tb* i nie pozwalają uznać metody opartej na pomiarze IFN- γ jako wystarczającej do wyłącznego diagnozowania gruźlicy płuc, w tym również jej postaci skąpoprątkowej. Równie zawodna wydaje się być diagnostyka oparta o zastosowanie dwóch testów, tuberkulinowego i interferonowego jednocześnie, które zatem nie ułatwiają w sposób oczekiwany diagnozowania gruźlicy skąpoprątkowej i jednocześnie nie zwalniają z obowiązku wykonania klasycznych badań diagnozowania gruźlicy, która pozostaje złotym standardem w wykrywaniu chorych z aktywną gruźlicą [**publikacja A2**].**

Poważne utrudnienie w zwalczaniu gruźlicy stanowi zasięg zakażeń latentnych *M.tb*, które występują u około 2 miliardów ludzi. Dla rozwiązania tego problemu konieczne są wiarygodne testy do wykrywania latentnej TB i sposoby monitorowania stanów wyprzedzających konwersję do aktywnej choroby gruźliczej. Obecnie, testy IGRA stanowią narzędzie diagnostyczne do wykrywania latentnych zakażeń prątkami gruźlicy. Jednak do tej pory nie opracowano żadnych testów referencyjnych weryfikujących trafność diagnostyczną testów interferonowych. Podejmując wskazany problem wykonano test QuantiFERON® Gold In Tube w trzech grupach nigdy nie chorujących na TB zdrowych osób zamieszkujących Łódź i województwo łódzkie: grupie wieloletnich pracowników oddziałów gruźliczych (kontakty zawodowe), członków rodzin pacjentów ze świeżo wykrywaną aktywną gruźlicą płuc (kontakty domowe) oraz osób, które w wywiadzie nie wskazywały zawyżonej ekspozycji na zakażenie prątkami gruźlicy (grupa kontrolna). Częstość dodatnich testów IGRA świadczących o

latentnym zakażeniu *M.tb* w grupie kontrolnej (13%) była znamienne niższa niż w grupie kontaktów domowych (27%) oraz grupie kontaktów zawodowych (44%). Trafność schematu potwierdziło wystąpienie takiego samego procentu (13%) osób IGRA-dodatnich wśród nie mających kontaktu z chorymi na TB pacjentów z ostrymi nieprątkowymi infekcjami płuc [**publikacja A2**]. Podobny procent latentnych zakażeń *M.tb* stwierdzano wśród zdrowych mieszkańców Niemiec. Natomiast alarmująco wysoki jest odsetek (44%) dodatnich testów IGRA u pracowników oddziałów gruźliczych, znacznie wyższy niż stwierdzany w Niemczech (10%) lub we Francji (19%) [28, 44]. Częstsze występowanie utajonych infekcji *M.tb* wśród długoletnich pracowników opieki medycznej rekrutowanych z oddziałów szpitalnych i poradni leczenia gruźlicy niż u kontaktów domowych wskazuje na znaczenie czasu ekspozycji na prątki dla utrwalenia się zakażenia gruźliczego. Natomiast znacznie wyższy odsetek (27%) osób z latentnym zakażeniem *M.tb* wśród domowników prątkujących pacjentów z aktywną gruźlicą płuc niż w grupie kontrolnej (13%) jest ważnym sygnałem świadczącym o konieczności szybkiej identyfikacji chorych z aktywną gruźlicą i wykonywania testu IGRA u osób pozostających z nimi w kontakcie, którzy po zakażeniu *M.tb* zwiększają rezerwuuar prątków gruźlicy i którzy w stanie zagrożenia osłabieniem sprawności układu obronnego mogą z dużym prawdopodobieństwem zachorować na aktywną gruźlicę.

Walkę z gruźlicą utrudnia przetrwały charakter tego schorzenia. Dlatego w celu zweryfikowania przydatności testu IGRA – QuantiFERON® Gold In Tube do oceny rozprzestrzeniania się zakażeń *M.tb* w sytuacji podwyższonego ryzyka ich występowania, u losowo wybranych przedstawicieli grupy kontaktów zawodowych, grupy kontaktów domowych i grupy kontrolnej, badanych w roku 2011, powtórnie wykonano test IGRA w roku 2013. Badania te wykazały znaczne zmiany w częstości występowania utajonych zakażeń prątkami [**publikacja A1**]. W roku 2011 latentne zakażenie *M.tb* wykryto u 33% zdrowych domowników prątkujących pacjentów, 55% pracowników szpitala i przychodni leczenia gruźlicy i żadnej ze zdrowych osób. Dwa lata później odsetek zakażonych latentnie osób wśród zdrowych członków rodzin pacjentów był prawie dwukrotnie wyższy (60%), natomiast w grupie osób z zawodowym kontaktem z prątkami obserwowano spadek odsetka (rewersję) dodatnich wyników IGRA do 41%. Wśród osób zdrowych z grupy kontrolnej konwersję wyniku testu IGRA z ujemnego w dodatni stwierdzono u jednej osoby badanej (7%). Świadczy to o tym, że utajone zakażenia *M.tb* w Polsce pozostają ważnym problemem. Obserwowana rewersja testu interferonowego u osób długotrwale ekspozowanych na prątki jest trudna do wyjaśnienia. Po pierwsze można przypuszczać, że jest związana z ograniczeniami wynikającymi z technicznego wykonania testu, ponieważ rewersję IGRA obserwowano częściej wśród osób z bazowym stężeniem IFN- γ bliskim wartości cut-off wyznaczonej przez producenta (0,35 IU/ml= 14 pg/ml) [**publikacja A1**]. W niektórych jednak przypadkach, w których bazowy poziom IFN- γ znacznie przekraczał wartość progową trudno obecność rewersji wytłumaczyć w wyżej wspomniany sposób. Niektórzy autorzy proponują wyjaśnić zjawisko rewersji poprzez spontaniczną lub będącą konsekwencją przeciwprątkowej terapii np. izoniazidem eradykację bakterii [18, 45]. Trudno jednak zastosować to wytłumaczenie do wszystkich analizowanych

przypadków, w tym do tych obserwowanych w badaniach własnych, ze względu na fakt, iż żadna z osób zidentyfikowanych w 2011 roku jako latentnie zakażona nie została poddana leczeniu przeciwprątkowemu. W światowej literaturze nie ma ponadto żadnych dowodów na to, by osoba IGRA(+) stawała się IGRA(-) po zastosowaniu terapii przeciwprątkowej. Możliwe jest zatem przyjęcie, że wyniki testu IGRA podlegają dynamicznej zmienności, zwłaszcza w warunkach długotrwałego narażenia na kontakt z prątkami gruźlicy. W naszych badaniach rewersję IGRA obserwowano tylko w grupie kontaktów zawodowych. Mamy prawo sądzić, że ogólny status odpornościowy tej grupy różnił się od przeciętności, gdyż u ponad połowy osób w tej grupie stwierdziliśmy ujemne testy IGRA, świadczące o braku latentnego zakażenia *M.tb* pomimo wieloletniej zawyżonej ekspozycji na te bakterie.

Analiza ilościowa poziomu IFN- γ wskazująca na konwersję lub rewersję wyniku testu IGRA wydaje się być pomocnym wskaźnikiem w monitorowaniu ryzyka rozwoju gruźlicy u osób narażonych na ciągły kontakt z chorobotwórczymi prątkami. Ocena stężenia tej cytokiny produkowanej w odpowiedzi na antygeny *M.tb* może mieć szczególne znaczenie zwłaszcza u osób odznaczających się już na początku wysokim bazowym poziomem IFN- γ , który może wskazywać na niedawne zakażenie mykobakteriami. W badaniach u myszy wykazano korelację pomiędzy odpowiedzią limfocytów T na specyficzny antygen prątków gruźlicy ESAT-6 i filtrat hodowli tych bakterii (CFP-10) oraz replikacją *M.tb in vivo* i progresją zmian chorobowych [2]. Wydaje się, że podobnie u ludzi, nasilenie produkcji IFN- γ w odpowiedzi na ESAT-6 i CFP-10 u osób z latentnym zakażeniem *M.tb* może zapowiadać konwersję infekcji do aktywnej gruźlicy [2, 18]. Jednak ze względu na fakt, że nawet długoletnia ekspozycja na *M.tb* u niektórych osób (kontakty zawodowe) nie doprowadza do rozwoju efektorowych limfocytów T odpowiadających produkcją IFN- γ na specyficzne antygeny tych bakterii ilościowa analiza stężenia IFN- γ nie może być jedynym sposobem oceny stopnia ryzyka rozwoju gruźlicy. Opierając się na spostrzeżeniu, że aktywnej gruźlicy towarzyszył znamieny wzrost surowiczego poziomu sCD14 w grupie osób latentnie zakażonych oceniono przydatność oznaczenia surowiczego stężenia sCD14 jako pomocniczego wskaźnika w predykcji rozwijającego się procesu chorobowego. Uzyskane wyniki nie wykazały różnic w zawartości sCD14 w surowicach osób, które uległy konwersji testu IGRA, wskazując, że **monitorowanie poziomu sCD14 w surowicy może zmniejszyć prawdopodobieństwo fałszywego prognozowania rozwoju czynnej TB u osób z latentnym zakażeniem *M.tb*, u których obserwuje się wzrost stężenia IFN- γ w hodowlach krwi stymulowanej specyficznymi antygenami prątków gruźlicy w powtarzanych testach interferonowych [publikacja A1].**

Wyniki dotyczące jakościowej i ilościowej analizy oznaczania markerów odpowiedzi adaptacyjnej na antygeny *M. tuberculosis* w diagnozowaniu pacjentów z aktywną gruźlicą płuc oraz zdrowych osób z pozostających z nimi w domowym lub zawodowym kontakcie przedstawiono w

postaci doniesień plakatowych i ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych [doniesienia 23, 27, 30, 33, 34].

Za najważniejsze wyniki w tej części badań należy uznać:

- 1) wykazanie zawodności łącznego wykonywania testu interferonowego (IGRA) i testu tuberkulinowego (TST) w diagnozowaniu aktywnej gruźlicy
- 2) wskazanie konieczności szybkiej identyfikacji chorych na gruźlicę i wzmożonego, długotrwałego nadzoru osób pozostających z nimi w domowym kontakcie (domowników) poprzez wykonywanie u nich testu IGRA, co potwierdza:
 - a) znamienne podwyższony odsetek domowników z latentnym zakażeniem prątkami gruźlicy w porównaniu do populacji nie pozostającej w kontakcie z chorymi na aktywną gruźlicę,
 - b) zanotowana konwersja testu IGRA u domowników w powtórnym badaniu wykonanym po 2 latach
- 3) wykazanie zaskakująco dużego odsetka dodatnich wyników testu IGRA wśród wieloletnich pracowników oddziałów gruźliczych, który wraz z tendencją do ulegania rewersji testu IGRA sugeruje, że wyniki tego testu podlegają dynamicznej zmienności w warunkach długotrwałego narażenia na kontakt z *M.tb*
- 4) pokazanie, że uzupełnienie oceny jakościowej (IGRA) o ilościową analizę produkcji IFN- γ w odpowiedzi na specyficzne antygeny patogenu i uwzględnienie wzrastającego stężenia rozpuszczalnej formy receptora sCD14 w surowicy, może pozwolić na, chociaż przybliżone, prognozowanie reaktywacji latentnego zakażenia *M.tb* w aktywną gruźlicę

I.6. Własna uproszczona metoda identyfikowania kwasów mykoloowych ściany komórkowej mykobakterii zastosowana do wykrywania obecności prątków *M. tuberculosis* w płwocinie chorych na gruźlicę płuc.

Niezbędnym warunkiem poprawy sytuacji epidemiologicznej gruźlicy jest wdrożenie szybkich i wiarygodnych metod diagnozowania umożliwiających wczesne wykrywanie zakażenia *M.tb*, podjęcie właściwego, kontrolowanego jej leczenia i monitorowanie postępów wdrożonej terapii. Mimo dostępności wielu różnorodnych metod diagnozowanie gruźlicy pozostaje nadal trudne i czasochłonne. Osiągnięcie złotego standardu diagnostycznego jest trudne ze względu immanentną cechą prątków gruźlicy, jaką jest długi czas generacji tych bakterii wynoszący około 18 godzin. Nowoczesne systemy hodowli prątków z możliwością wyznaczania ich oporności na leki przeciwpłatkowe, a także metody genetyczne wykrywania kwasów nukleinowych *M.tb* bezpośrednio w materiałach klinicznych, usprawniły co prawda diagnostykę gruźlicy, lecz nie są dostępne we wszystkich laboratoriach diagnostycznych. Z tego powodu poszukuje się nowych metod pozwalających szybciej i pewniej rozpoznawać gruźlicę oraz podejmować właściwą terapię przerywającą rozsiew *M.tb* w populacji. W nurt takich poszukiwań włączają się badania własne zmierzające do opracowania innowacyjnej metody LC-MS/MS do wykrywania gruźlicy opartej o wykorzystanie kwasów mykoloowych mykobakteryjnej ściany komórkowej. Kwasy mykoloowe są jednymi z podstawowych elementów budowy ściany komórkowej bakterii rzędu *Actinomycetales*, podrzędu *Corynebacterineae*, w tym rodziny *Mycobacteriaceae*. Związki te, stanowiące znaczącą (20–40%) część suchej masy komórek bakterii, są długołańcuchowymi α -hydroksy β -alkilo kwasami tłuszczowymi, w budowie których wyróżnia się

dłuższy łańcuch meromykolowy oraz krótszy łańcuch α -alkilowy. Odgrywają ważną rolę w strukturze bakteryjnej ściany komórkowej wpływając na jej integralność oraz przepuszczalność względem związków o charakterze hydrofilowym i hydrofobowym, a także chronią komórki przed negatywnym wpływem stresu oksydacyjnego. Kwasy mykolowe posiadają wiele cech, pozwalających na sklasyfikowanie ich jako potencjalne markery diagnostyczne [38, 40]. Są one ściśle i nierozdzielnie związane z bakteryjną ścianą komórkową, nie podlegają syntezie w organizmie człowieka, a ich wysoka stabilność chemiczna pozwala na wykrycie tych związków w materiale badanym bez względu na stan fizjologiczny komórki bakteryjnej, w tym nawet w materiale archeologicznym. Podrząd *Corynebacterineae* charakteryzuje się wielką różnorodnością pod względem profili kwasów mykolowych ściany komórkowej, a ich struktura jest jednym z wykładników podobieństwa międzygatunkowego. Pod względem wielkości cząsteczek tych kwasów w całym podrzędzie wykrywa się związki o długości od 22 do 110 atomów węgla, zaś w ścianie komórkowej prątków struktury te składają się z 60-90 atomów węgla zawierając w pełni nasycony 22-, 24- lub 26-węglowy łańcuch węglowodorowy typu α [**publikacja A9**]. Dominującym typem kwasów mykolowych *M.tb* są α -mikolany, zawierające podwójne wiązania węglowe lub pierścienie cyklopropanowe. Oprócz nich w mykobakteryjnej ścianie komórkowej występują jeszcze ketomikolany i metoksymikolany posiadające w pozycji proksymalnej pierścienie cyklopropanowe w konformacji *cis* lub *trans*, a w pozycji dystalnej odpowiednio grupę tlenową lub metoksyłową.

Kwasy mykolowe jako potencjalny biomarker obecności prątków gruźlicy znany jest od wielu lat, a do kompleksowej analizy tych struktur wykorzystywane są różne techniki analizy chemicznej [Brennan i Nikaido, 1995; Takayama i wsp. 2005; Fujiwara i wsp., 2012]. We współpracy podjętej z dr Rafałem Szewczykiem z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Przemysłowej UŁ opracowano metodykę LC-MS/MS opartą o podwójną filtrację w analizatorach masowych (MRM, ang. *Multiple Reaction Monitoring*) stwarzającą szansę selektywnej, specyficznej i czulej detekcji mykobakteryjnych kwasów mykolowych w płwocinie pacjentów z gruźlicą płuc [**publikacja A4**]. Analiza w trybie monitorowania jonów molekularnych(Q1) potwierdziła, że kwasy mykolowe *M.tb* są zróżnicowaną grupą związków, których występowanie obserwuje się w zakresie mas od 1050 do 1380 Da. Celem odróżnienia molekuł o tej samej masie cząsteczkowej, ale innej budowie strukturalnej zastosowano tryb prekursorowy poszukując cząsteczek o stosunku masy do ładunku wynoszącym 395,5 m/z, 367,5 m/z oraz 339,4 m/z, co odpowiada długości łańcucha α -alkilowego składającego się z 26, 24 bądź 22 atomów węgla [**publikacja A4**]. Analiza widm spektralnych wskazała na wyraźną dominację wśród kwasów mykolowych *M.tb* łańcuchów zawierających 26 atomów węgla. Uzyskane widma cechowały się zdecydowaną przewagą fragmentacji pomiędzy węglami w pozycji α i β , co związane było z powstawaniem, ulegających jonizacji ujemnej, łańcucha α -węglowodorowego oraz domeny α -alkilowej pozbawionej grupy hydroksylowej. Na podstawie jakościowej analizy widm masowych wyselekcjonowano i zoptymalizowano parametry dla 60 par MRM najczęściej występujących kwasów

mykolowych, spośród których wybrano 10, reprezentujących alfa-, keto- i metoksymykolony tych bakterii, o potencjalnie największym znaczeniu dla identyfikacji *M.tb* (1136/395, 1136/367, 1164/395, 1192/395, 1220/395, 1252/395, 1252/367, 1264/395, 1278/395, 1280/395). Przydatność wyselekcjonowanych parametrów MRM w identyfikacji *M.tb* potwierdzono wykorzystując ekstrakty kwasów mykolowych uzyskane zgodnie z zoptymalizowaną metodyką alkalicznej hydrolizy lipidów ścianny komórkowej wzorcowego szczepu *M.tb* H₃₇R_v (ATCC 27294) oraz klinicznych izolatów prątków gruźlicy pochodzących z referencyjnego Laboratorium Biologii Prątka w Łodzi. W przypadku każdego z analizowanych izolatów klinicznych *M.tb* zaobserwowano dominację 10 kwasów mykolowych, tych samych, które wyselekcjonowano jako związki o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym. Dla określenia swoistości oznaczeń typu MS/MS przeprowadzono procedurę ekstrakcji lipidów ze ścianny komórkowej drobnoustrojów należących do podrzędu *Corynebacterineae*, jak i odległych filogenetycznie, nie obserwując żadnych sygnałów odpowiadających kwasom mykolowym występującym u *Mycobacterium*. Przydatność opracowanej metodyki w diagnozowaniu zakażenia *M.tb* zweryfikowano wykorzystując materiał kliniczny (plwocinę) uzyskany od pacjentów z gruźlicą płuc, chorych z infekcjami płuc o etiologii innej niż prątkowa oraz zdrowych ochotników, poddając go albo bezpośrednio analizie LC-MS/MS lub pośrednio po 10-dniowej hodowli w podłożu Middlebrook'a. Obecność kwasów mykolowych o charakterystycznym dla *M.tb* profilu wykazano w badanych bezpośrednio po opracowaniu plwocinach 69% chorujących na TB pacjentów, podczas gdy po zastosowaniu 10-dniowej inkubacji materiałów w podłożu odsetek pozytywnych wyników wzrastał do 94% [**publikacja A4**]. Warto wspomnieć, że opracowaną metodą *M.tb* wykrywano również w plwocinie chorych, u których nie zdiagnozowano gruźlicy klasycznymi metodami bakterioskopii i posiewu. W plwocinach żadnego spośród chorych z niegruźliczym zapaleniem płuc, a także żadnego zdrowego ochotnika nie wykrywano obecności sygnału charakterystycznego dla kwasów mykolowych. Opracowana metodyka LC-MS/MS wykazała możliwość identyfikacji gatunkowej prątków atypowych. Badane szczepy prątków niegruźliczych – *M. avium*, *M. abscessus*, *M. kansasii* oraz *M. intracellulare*, wybrane ze względu na najczęstszy odsetek izolacji w Polsce, charakteryzowały się znacząco odmiennym od siebie i *M.tb* wzajemnym stosunkiem ilościowym poszczególnych mykolanów, cechując się przewagą kwasów mykolowych o krótszych łańcuchach α -alkilowych. Skuteczne różnicowanie prątków gruźlicy od niegruźliczych ma ogromne znaczenie ze względu na odmienny profil lekooporności tych dwóch grup mykobakterii. Błędna identyfikacja gatunkowa prątków wyizolowanych od chorego prowadząca do uznania mykobakteriozy za gruźlicę lekooporną skutkuje niepotrzebną terapią chorych, a także stanowi olbrzymie niebezpieczeństwo dla ich zdrowia. **Własna skringowa metoda LC-MS/MS diagnozująca zakażenia prątkami na podstawie profilu ich kwasów mykolowych ma szansę znacząco zoptymalizować i przyspieszyć postępowania diagnostyczne w chorobach wywoływanych przez mykobakterie [publikacja A4].**

Za najważniejsze wyniki w tej części badań należy uznać:

- 1) opracowanie uproszczonej metody do identyfikacji kwasów mykolewych *M.tb* oraz mykobakterii spoza grupy *M. tuberculosis complex*
- 2) wykazanie, że opracowana metoda identyfikowania *M. tuberculosis* w oparciu o produkowane przez nie kwasy mykolewe stwarza szansę zastosowania jej do szybszego niż do tej pory diagnozowania chorych z aktywną gruźlicą.

I.7. Podsumowanie

Prezentowane w ramach osiągnięcia naukowego wyniki badań wykazały po raz pierwszy, że już na wczesnym etapie reakcji makrofagów na prątki gruźlicy może dochodzić do nadekspresji inicjujących kaskadę sygnałową receptorów CD14 i regulującej międzykomórkowe interakcje integryny LFA-1, która z jednej strony charakteryzuje odpornościowy stan promujący rozwój aktywnej gruźlicy, a z drugiej strony stanowi nowy biomarker tego schorzenia. Przeciwnie, silniejsza ponad przeciętną ekspresja błonowego receptora mCD14 na adherentnych monocytach korelowała z brakiem skórnej nadwrażliwości późnej na tuberkulinę u zdrowych osób immunizowanych w dzieciństwie szczepionką BCG. Spośród badanych polimorfizmów genów kodujących produkty istotne dla funkcji makrofagów żaden nie może być uznany za stanowiący podwyższone lub obniżone ryzyko zachorowania na gruźlicę w polskiej populacji kaukaskiej. Porównawcze badania parametrów odpornościowych charakteryzujących pacjentów z aktywną gruźlicą płuc lub nieprątkową infekcją układu oddechowego oraz zdrowe osoby z lub bez latentnego zakażenia *Mycobacterium tuberculosis*, podkreślają znaczenie testu interferonowego QuantiFERON®Gold In Tube, uzupełnionego o ilościową ocenę wytwarzania IFN- γ w odpowiedzi na specyficzne antygeny prątków gruźlicy oraz pomiar surowiczego poziomu rozpuszczalnego receptora sCD14, w monitorowaniu latentnych zakażeń *M. tuberculosis* u osób pozostających w domowym kontakcie z pacjentami chorującymi na gruźlicę płuc. Jednocześnie wykazano zawodność testu IGRA wykonywanego wraz z testem tuberkulinowym w diagnozowaniu pacjentów z aktywną gruźlicą płuc. Istotnym krokiem w pokonaniu tego problemu jest zaproponowana uproszczona metoda LC-MS/MS diagnozowania takich pacjentów na podstawie kwasów mykolewych prątków gruźlicy wykrywanych w płwocinie.

I.8. Literatura

1. Alagarasu K, Selvaraj P, Swaminathan S, Raghavan S, Narendran G, Narayanan PR. *Mannose binding lectin gene variants and susceptibility to tuberculosis in HIV-1 infected patients of South India.* Tuberculosis (Edinb.) 2007; 87:535-43
2. Andersen P, Doherty TM, Pai M, Weldingh K. *The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted?* Trends Mol Med 2007; 13:175-82
3. Ayaslioglu E, Tekeli E, Birengel S. *Significant elevation of serum soluble CD14 levels in patients with brucellosis.* Jpn J Infect Dis 2005; 58:11-14

4. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. *A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E.* Am J Respir Cell Mol Biol 1999; 20:976-83
5. Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. *Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients.* Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11:625-26
6. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, Mcadam KPW, Whittle HC, Hill AV. *Variations in the Nramp1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans.* N Engl J Med 1998; 338:640-644
7. Bhatt K, Salgame P. *Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Immunol 2007; 27:347-62
8. Carvalho A, Marques A, Maciel P, Rodrigues F; *Study of disease-relevant polymorphism in the TLR4 and TLR9 genes: a novel method applied to the analysis of Portuguese population.* Mol Cell Probes 2007; 21:316-20
9. Cobat A, Gallant CJ, Simkin L, Black GF, Stanley K, Hughes J, Doherty TM, Hanekom WA, Eley B, Jaïs JP, Boland-Auge A, van Helden P, Casanova JL, Abel L, Hoal EG, Schurr E, Alcaïs A. *Two loci control tuberculin skin test reactivity in an area hyperendemic for tuberculosis.* 2009, 206:2583-2591
10. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Eguale T, Ravn P, Andersen P. *Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients.* J Clin Microbiol 2002 40:704-706
11. Dorhoi A, Kaufmann SH. *Perspectives on host adaptation in response to Mycobacterium tuberculosis: modulation of inflammation.* Semin Immunol. 2014, 26: 533-542.
12. Durieux JJ, Vita N, Popescu O, Guette F, Calzada-Wack J, Munker R, Schmidt RE, Lupker J, Ferrara P, Ziegler-Heitbrock HW, Labeta MO. *The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes.* Eur J Immunol 1994, 24(9): 2006-2012
13. Egerer K, Feist E, Rohr U, Pruss A, Burmester GR, Dorner T. *Increased serum soluble CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic lupus erythematosus.* Lupus 2000; 9; 614-21;
14. El Sahly HM, Reich RA, Dou SJ, Musser JM, Graviss EA; *The effect of mannose binding lectin gene polymorphism on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups.* Scand J Infect Dis 2004; 36; 106-08
15. Fol M, Zawadzka K, Druszczyńska M, Kowalewicz-Kulbat M, Rudnicka W. *Vaccination against M. tuberculosis – what next after BCG?* Post Hig Med Dośw 2011; 65: 93-103
16. Greenwood CMT, Fujiwara TM, Boothroyd LJ, Miller MA, Frappier, D, Fanning EA, Schurr E, Morgan K. *Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including Canadian family.* Am J Hum Genet 2000; 67:405-416
17. Griga T, Klein W, Epplen JT, Hebler U, Stachon A, May B. *CD14 expression on monocytes and soluble CD14 plasma levels in correlation to the promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene in patients with inactive Crohn's disease.* Hepatogastroenterology 2005; 52:808-811
18. Guillén MA. *Advances in the diagnosis of tuberculosis infection.* Arch Bronconeumol 2011; 47:521-530
19. Haidari M, Hajilooi M, Reza zadeh M, Rafiei A, Alavi SA, Keramat F; *Polymorphism in the promoter region of the CD14 gene and susceptibility to brucellosis.* Immunol Invest 2006; 35:239-45
20. Institute of Tuberculosis and Lung Diseases. org [Internet]. Bulletin 2015. [cited 2016 April 22] Available from: <http://www.igichp.edu.pl/>
21. Kabesch M, Hasemann K, Schickinger V, Tzotcheva I, Bohnert A, Carr D, Baldini M, Hackstein H, Leupold W, Weiland SK, Martinez FD, Mutius E, Bein G; *A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases.* Allergy 2004; 59; 520-25
22. Karhukorpi J, Yan Y, Niemela S, Valtonen J, Koistinen P, Joensuu T, Saikku P, Karttunen R; *Effect of CD14 promoter polymorphism and H. pylori infection and its clinical outcomes on circulating CD14.* Clin Exp Immunol 2002; 128:326-32
23. Kaufmann SH, Dorhoi A. *Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances and interventions.* Curr Opin Immunol 2013; 25:441-449
24. LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, Vercelli D. *A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity;* J Immunol 2001; 167:5838-44
25. Lin J, Yao YM, Huang ZH, Yu Y, Zhu JM, Chai JK, Sheng ZY. *The influence of CD14 genomic polymorphism on CD14 gene expression as well as protein release and its clinical significance in patients with extensive burns.* Zhonghua Wai Ke Za Zhi 2006; 44: 907-10
26. Marks SM, Taylor Z, Qualls NL, Shrestha-Kuwahara RJ, Wilce MA, Nguyen CH. *Outcomes of contact investigations of infectious tuberculosis patients.* Am J Respir Crit Care Med 2000, 162:2033-2038

27. Newport MJ, Allen A, Awomoyi AA, Dunstan SJ, McKinney E, Marchant A, Sirugo G. *The Toll-like receptor 4 Asp299Gly variant: no influence on LPS responsiveness or susceptibility to pulmonary tuberculosis in the Gambia*. Tuberculosis (Edinb.) 2004; 84:347-52
28. Nienhaus A, Schablon A, Preissner AM, Ringshausen FC, Diel R. Tuberculosis in healthcare workers – a narrative review from a German perspective. J Occup Med Toxicol 2014; 9:9
29. Nores RJE, Bensussan A, Vita N, Stelter F, Arias MA, Jones M, Lefort S, Borysiewicz LK, Ferrara P, Labeta MO. *Soluble CD14 acts as a negative regulator of human T cell activation and function*. Eur J Immunol 1999; 29:265-276
30. North RJ, LaCourse R, Ryan L, Gros P. *Consequence of Nramp1 deletion to Mycobacterium tuberculosis infection in mice*. Infect Immun 1999; 67:5811-14
31. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O. *The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease*. Eur Respir J 2004; 23:219-23
32. Ottenhoff THM. *The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2012; 16:1424-32
33. Pacheco E, Fonseca C, Montes C, Zabaleta J, Garcia LF, Arias MA; *CD14 gene promoter polymorphism in different clinical forms of tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 40:207-13
34. Rosas-Taraco AG, Revol A, Salinas-Carmona MC, Rendon A, Caballero-Olin G, Arce-Mendoza AY. *CD14 C(-159)T polymorphism is a risk factor for development of pulmonary tuberculosis*; J Infect Dis 2007; 196:1698-706
35. Rudnicka W. *Molekularne mechanizmy odporności na gruźlicę*. Post Mikrobiol 2004; 43; 107-27;
36. Rupp J, Goepel W, Kramme E, Jahn J, Solbach W, Maass M. *CD14 promoter polymorphism -159C>T is associated with susceptibility to chronic Chlamydia pneumoniae infection in peripheral blood monocytes*. Genes Immun 2004; 5; 435-38
37. Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, Bossink A, Dheda K, Diel R, Dominguez J, Lipman M, Nemeth J, Ravn P, Winkler S, Hiutric E, Sandgren A, Manissero D. *Interferon-release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systemic review and meta-analysis*. Eur Respir J 2011; 37:100–11
38. Shui G, Bendt AK, Jappar IA, Lim HM, Laneelle M, Hervé M, Via LE, Chua GH, Bratschi MW, Zainul Rahim SZ, Michelle AL, Hwang SH, Lee JS, Eum SY, Kwak HK, Daffé M, Dartois V, Michel G, Barry CE 3rd, Wenk MR. *Mycolic acids as diagnostic markers for tuberculosis case detection in humans and drug efficacy in mice*. EMBO Mol Med. 2012; 4(1):27-37
39. Soborg C, Andersen AB, Madsen HO, Kok-Jensen A, Skinhoj P, Garred P. *Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis*. J Infect Dis 2002; 186: 517-21
40. Song SH, Park KU, Lee JH, Kim EC, Kim JQ, Song J. *Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species*. J Microbiol Methods. 2009; 77: 165-77
41. Suske G; *The Sp-family of transcription factors*. Gene 1999; 238: 291-300
42. Texereau J, Chiche D, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. *The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections*. Clin Infect Dis 2005; 41: S408-15
43. Trevisiol C, Boniotto M, Giglio L, Poli F, Morgutti M, Crovella S. *MBL2 polymorphisms screening in a regional Italian CF Center*. Cyst Fibros 2005; 4: 189-91
44. Tripodi D, Brunet-Courtois B, Nael V, Audrain M, Chailleux E, Germaud P, Naudin F, Muller JY, Bourrut-Lacouture M, Durand-Perdriel MH, Gordeeff C, Guillaumin G, Houdebine M, Raffi F, Boutoille D, Biron C, Potel G, Roedlich C, Geraut C, Schablon A, Nienhaus A. *Evaluation of the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay for TB screening in French healthcare workers*. J Occup Med Toxicol 2009; 30: 30
45. Veerapathran A, Joshi R, Goswami K, Dogra S, Moodie EE, Reddy MV, Kalantri S, Schwartzman K, Behr MA, Menzies D, Pai M. *T-cell assays for tuberculosis infection: deriving cut-offs for conversions using reproducibility data*. PLoS One 2008; 26, 3(3):e 1850.
46. World Health Organization.org [Internet]. Global Tuberculosis Report 2015. [cited 2016 April 24]. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

II. Krótki opis pracy naukowo-badawczej wykraczającej poza osiągnięcie naukowe stanowiące monotematyczny cykl publikacji

II.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych

Tytuł magistra biologii, specjalność mikrobiologia, uzyskałam w 1999 roku po obronie pracy magisterskiej zatytułowanej „Kompleksy immunologiczne w zakażeniach wywołanych przez pałeczki *Helicobacter pylori*” realizowanej w ówczesnym Zakładzie Biologii Infekcyjnej UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesławy Rudnickiej. W trakcie studiów w latach 1994/1995, 1995/1996, 1996/1997 otrzymałam Listy Gratulacyjne Rektora UŁ, a w roku akademickim 1998/1999 wyróżniona zostałam Stypendium Ministra Edukacji Narodowej. Na zakończenie studiów na UŁ zostałam nagrodzona Medalem za Chlubne Studia. Badania realizowane w ramach pracy magisterskiej wykazały, że tworzące się w ustroju swoiste kompleksy Lewis X-anty-Lewis X IgG mogą odgrywać ważną rolę w nasilaniu reakcji zapalnej rozwijającej się na powierzchni błony śluzowej żołądka u osób zakażonych *H. pylori* oraz warunkować zróżnicowany przebieg choroby. Aktualne zakażenie pałeczkami *H. pylori* u dzieci może sprzyjać powstawaniu kompleksów immunologicznych Lewis X-anty-Lewis X IgG, natomiast tworzenie się takich kompleksów u osób dorosłych prawdopodobnie jest uwarunkowane współdziałaniem wielu różnych czynników. Częstsze występowanie swoistych kompleksów immunologicznych Lewis X-anty-Lewis X IgG w surowicach pacjentów zakażonych *H. pylori*, a także wykrywanie antygenów *H. pylori*, innych niż Lewis X, w kompleksach wytrącanych z surowic takich osób za pomocą PEG może wskazywać na udział kompleksów immunologicznych w nasilaniu reakcji zapalnej w zakażeniach wywołanych przez pałeczki *H. pylori*. Wyniki pracy magisterskiej zostały zawarte w trzech artykułach [publikacje D1, D2, D4] i w 5 doniesieniach konferencyjnych [doniesienie 1, 2, 3, 41, 42].

Po zakończeniu studiów magisterskich podjęłam studia doktoranckie (1999-2003) w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Fizjologiczno-Mikrobiologicznego UŁ w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesławy Rudnickiej podejmując tematykę indukowanej przez antygeny prątków odpowiedzi odpornościowej w kontekście tuberkulinowej nadwrażliwości późnej. W roku 2001 zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ. Dysertacja doktorska zatytułowana „Odpowiedź proliferacyjna i sekrecyjna na antygeny mykobakterii u zdrowych osób szczepionych BCG i chorych na gruźlicę” była podstawą nadania mi przez Radę Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego stopnia doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia w zakresie mikrobiologii, w dniu 25 marca 2003r. W roku 2004, moja praca doktorska została wyróżniona Indywidualną Nagrodą III stopnia Rektora UŁ. Badania prowadzone w trakcie pracy doktorskiej finansowane były m.in. przez Komitet Badań Naukowych w ramach grantu promotorskiego o numerze 6 PO5D 08421 „Reaktywność obwodowych limfocytów T zdrowych osób szczepionych BCG, na antygeny *Mycobacterium*” (2001-2003), którego byłam głównym wykonawcą. Realizowane w ramach

doktoratu zadania badawcze miały na celu porównanie odpowiedzi proliferacyjnej i sekrecyjnej obwodowych limfocytów T, izolowanych od szczepionych BCG zdrowych osób, wykazujących dodatnią lub ujemną skórną reakcję DTH na tuberkulinę, na wybrane antygeny *Mycobacterium*, oraz sprawdzenie zależności pomiędzy ocenianą *in vitro* odpowiedzią komórek a rozwijaną *in vivo* reaktywnością skórną na PPD. Antygeny prątków wykorzystywane w stymulacji komórek limfocytarnych uzyskano nawiązując kontakt z dr Kris Huygen z Instytutu Pasteura w Brukseli (Belgia), od której uzyskano oczyszczone antygeny *M. bovis* BCG (Hsp65, Ag85) oraz z prof. Johnem T. Belisle z Colorado State University (USA), od którego otrzymano lipoarabinomannan (LAM) *M.tb*. Uzyskane w pracy wyniki sugerowały, iż ocena proliferacji i produkcji IFN- γ w stymulowanych PPD hodowlach obwodowych limfocytów może być przydatna w monitorowaniu skuteczności szczepień BCG. Wyniki pracy doktorskiej zostały zawarte w 3 publikacjach [**publikacje D5, D6, D7**], a także w 4 doniesieniach konferencyjnych [doniesienia 4, 5, 6, 7].

Podczas wykonywania pracy doktorskiej uczestniczyłam również w prowadzonych w Zakładzie Biologii Infekcyjnej badaniach procesów metabolicznych uruchamianych w ludzkich granulocytach i monocytach pochłaniających żywe prątki *M. bovis* BCG. Zwrócono wtedy uwagę, że granulocyty izolowane z krwi zdrowych dawców różnią się zdolnością produkowania tlenu azotu w odpowiedzi na zakażenie prątkami BCG. Produkcja NO nie ulegała istotnemu nasileniu w środowisku IFN- γ , TNF- α lub GM-CSF. Natomiast TNF- α nasilał wybuch tlenowy w granulocytach, który ulegał osłabieniu po zakażeniu komórek prątkami BCG, w sposób zależny od liczby zakażających bakterii. Taka reakcja może mieć znaczenie w reaktywacji pierwotnych ognisk gruźliczych [**publikacja D3**].

Kontynuując te badania określono poziom humoralnych mediatorów fagocytozy, MBL, sCD14, IgG przeciwko PPD oraz mykobakterijnemu białku Hsp65, w surowicach zdrowych dawców szczepionych BCG w dzieciństwie, wykazujących dodatnią lub ujemną reakcję skórną na PPD. Nie stwierdzono jednak żadnych znaczących różnic w poziomie badanych czynników w surowicach tuberkulino dodatnich i tuberkulino ujemnych dawców. Nie stwierdzono również różnicy w pochłanianiu prątków BCG przez granulocyty i monocyty dawców tuberkulinoujemnych i tuberkulinododatnich. Nie obserwowano również związku pomiędzy intensywnością fagocytozy i stężeniem MBL, sCD14, IgG anty-PPD oraz IgG anty-Hsp65 w surowicy dodawanej do hodowli granulocytów i makrofagów. Uzyskane wyniki pozwoliły sugerować międzysobnicze zróżnicowanie wydolności makrofagów i granulocytów w pochłanianiu mykobakterii co może być ważnym wyznacznikiem losu atenuowanych prątków BCG używanych, jako szczepionka przeciwgruźlicza, a być może także wirulentnych prątków gruźlicy [**publikacja D8**].

II.2. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, dnia 1 października 2003r. zostałam zatrudniona na etacie adiunkta w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej. Głównym obiektem

zainteresowań mojej pracy naukowej po doktoracie pozostały mykobakterie, co wynikało z wagi problemu, jaki na świecie wciąż stanowią zakażenia *Mycobacterium tuberculosis*, mimo ponad 80-letniego stosowania przeciwgruźliczej szczepionki BCG. Dane epidemiologiczne jednoznacznie wskazują na niewystarczający efekt ochronny tej szczepionki, a osłabienie jej protekcyjnych właściwości obserwowane u osób dorosłych wciąż pozostaje niezrozumiałe. Dla wyjaśnienia tego zjawiska niezbędne jest lepsze poznanie mechanizmów odpornościowych wzbudzanych przez szczepienia BCG, mogących stanowić punkt odniesienia dla oceny właściwości protekcyjnych nowo konstruowanych szczepionek. Badając odpowiedź komórkową na szczepionkę BCG stwierdzono ogromną jej heterogenność przejawiającą się na poziomie reakcji skórnej na tuberkulinę, genów oraz cytokin produkowanych w odpowiedzi na antygeny mykobakterii [**publikacja C8**; doniesienia 35, 50]. Pomimo, że nie można utożsamiać stanu nadwrażliwości późnej na tuberkulinę z odpornością na gruźlicę, nie sposób zaprzeczyć, że mechanizm tuberkulinowej reakcji nadwrażliwości zarówno w fazie inicjacji, jak i efektorowej jest zbieżny z powszechnie uznawanym podstawowym mechanizmem reakcji odpornościowej mającej chronić przed gruźlicą. Biorąc pod uwagę, że rozwój reakcji nadwrażliwości typu późnego na PPD może zależeć od reaktywności uczestniczących w odpowiedzi przeciwprątkowej makrofagów i limfocytów T regulowanych przez wydzielane cytokiny, w badaniach oceniono produkcję IFN- γ , IL-10, IL-12 oraz TNF- α przez stymulowane PPD lub żywymi prątkami *M. bovis* BCG jednojądrzaste leukocyty izolowane z krwi obwodowej szczepionych BCG ochotników tuberkulinododatnich i tuberkulinoujemnych. Uzyskane wyniki wykazały występowanie odwrotnej korelacji pomiędzy intensywnością tuberkulinowej reakcji skórnej i produkcją IL-10 przez pobudzone PPD obwodowe limfocyty oraz znamienne silniejszą sekrecję IFN- γ przez stymulowane PPD limfocyty osób tuberkulinododatnich niż tuberkulinoujemnych [**publikacja B6**]. Nie stwierdzono natomiast różnic w produkcji IL-12 oraz TNF- α w stymulowanych prątkami BCG hodowlach pełnych zawiesin jednojądrzastych leukocytów krwi obwodowej ochotników tuberkulinoujemnych i tuberkulinododatnich [**publikacja C8**]. Wyniki takie sugerują, że niezdolność pewnych osób do rozwoju DTH na tuberkulinę w odpowiedzi na szczepionkę BCG może pozostawać w związku z pewną nadprodukcją IL-10, która znana jest z hamowania wytwarzania IFN- γ , a w konsekwencji adaptacyjnej odporności komórkowej. Sugestia ta znalazła potwierdzenie w znacznie częstszej produkcji IL-10 przez stymulowane PPD lub żywymi prątkami BCG komórki dendrytyczne ochotników tuberkulinoujemnych niż tuberkulinododatnich [**publikacja C4**]. Na podstawie analizy odsetka limfocytów T CD4+, T CD8+ i komórek NK w preparatach barwionych techniką EnVision™ zaobserwowano znamienne wyższy średni odsetek komórek T o fenotypie CD8+ w hodowlach komórek pochodzących od osób tuberkulinoujemnych w porównaniu do hodowli komórek osób tuberkulinododatnich, co pozwala sugerować, że nasilony rozwój i aktywność cytotoksycznych/supresorowych limfocytów CD8+ może negatywnie regulować powstawanie skórnej reaktywności na PPD [**publikacja C7**].

Biorąc pod uwagę, że zróżnicowana odpowiedź skórna na tuberkulinę może być uwarunkowana genetycznie, u tuberkulinoujemnych i tuberkulinododatnich ochotników szczepionych BCG oceniono

polimorfizm genów kodujących IL-10 (IL-10/-1082G/A) oraz receptor CD14 (CD14/-159C/T) [**publikacja C6**, doniesienie 60]. W grupie osób tuberkulinoujemnych stwierdzono znamienne częstsze ($p=0.02$) występowanie genotypu A/G (IL-10/-1082G/A), któremu towarzyszyła silna produkcja IL-10 przez stymulowane PPD limfocyty w porównaniu do grupy osób z dodatnią reakcją na tuberkulinę, w której większość ochotników cechowała się nosicielstwem homozygotycznej wersji genu (A/A lub G/G IL-10/-1082G/A), związanej ze słabą lub umiarkowaną produkcją tej cytokiny. Korelacji takiej nie stwierdzono wśród chorujących na gruźlicę pacjentów [doniesienie 11]. Oceniając relację między genotypem CD14 a rozwojem DTH na PPD stwierdzono natomiast, że osoby tuberkulinododatnie znamienne częściej niż tuberkulinoujemne posiadały genotyp C/C (CD14) ($p=0.05$). W badaniach nie stwierdzono związku pomiędzy surowiczym poziomem sCD14 a genotypem CD14, stwierdzając natomiast korelację pomiędzy średnicą odczynu tuberkulinowego a stężeniem sCD14 w grupie osób z dodatnią reakcją DTH na PPD [**publikacja C6**]. Wyniki uzyskane w zakresie badań dotyczących oceny występowania związku między polimorfizmami wybranych genów a nadwrażliwością późną na tuberkulinę zaprezentowano również w postaci doniesień plakatowych i ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych [doniesienie 8, 9, 10, 15, 20, 57].

Kontynuując badania związane z immunomodulacyjnym działaniem prątków podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy stosowane jako przeciwgruźlicza szczepionka atenuowane prątki *M. bovis* BCG, cechujące się zdolnością indukowania odpowiedzi limfocytów pomocniczych typu Th1, mogą osłabiać nadreaktywność efektorowych limfocytów typu Th2 prowadzącą do rozwoju choroby alergicznej. Zgodnie z oczekiwaniami, limfocyty dziewicze pacjentów z alergią stymulowane przez komórki dendrytyczne prezentujące alergen kurzu domowego Der p 1 wykazywały nadprodukcję IFN- γ , charakteryzującego fenotyp Th1 z jednoczesnym obniżeniem wydzielania IL-4 i IL-5, cytokin odpowiedzi Th2. Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać, że prątki BCG modulują przetwarzanie i prezentację antygeny przez komórki dendrytyczne w sposób sprzyjający rozwojowi odpowiedzi typu Th1 [**publikacja C2**; doniesienia 16, 47, 51, 53]. Dysponując rekombinowanym szczepem *M. bovis* BCG produkującym ludzką IL-18 (rBCGhIL-18), która działając synergistycznie wraz z IL-12 indukuje produkcję IFN- γ przez limfocyty Th1, w badaniach oceniono wpływ prątkowych antygenów na ekspresję receptorów synapsy immunologicznej oraz aktywność regulatorową komórek dendrytycznych wynikającą z profilu wydzielanych przez nie cytokin. Wykazano, że IL-18 uwalniana przez prątki rBCGhIL-18 nasilała ekspresję cząsteczek CD80 i CD86 na komórkach dendrytycznych osób szczepionych BCG, a także pobudzała wydzielanie przez te komórki IL-23, IL-10 i IP-10 silniej niż nierekombinowany szczep BCG. Sugestię pobudzania przez IL-18 rozwoju kluczowej dla przeciwaprątkowej odporności typu Th1 potwierdziły wyniki obrazujące nasilenie produkcji IFN- γ i IL-10 w hodowlach komórek dendrytycznych prezentujących antygeny prątków autologicznym limfocytom. Uzyskane wyniki pozwalają rozpatrywać obdarzoną immunomodulacyjnymi właściwościami IL-18 za cytokinę o potencjalnych możliwościach aplikacyjnych w kontekście udoskonalania przeciwgruźliczej szczepionki BCG [**publikacja B5**]. Charakterystykę tej cytokiny wraz

z jej potencjalnymi możliwościami terapeutycznymi przedstawiono w artykule poglądowym **[publikacja B9]**.

Realizując główny wątek swojej pracy naukowej związany ze zróżnicowaną odpowiedzią odpornościową wzbudzaną przez antygeny wirulentnych prątków *M.tb* podjęłam szeroką interdyscyplinarną współpracę z klinicystami z zakresu pulmonologii i chorób płuc u osób dorosłych i dzieci z Wojewódzkiego Zespołu Zakładów Opieki Zdrowotnej Centrum Leczenia Chorób Płuc i Rehabilitacji w Łodzi (WZZOZCLChPiR), a także specjalistami z zakresu diagnostyki prątka. Nawiązana współpraca doprowadziła do podpisania w roku 2009 dwustronnej umowy o współpracy pomiędzy Uniwersytetem Łódzkim i WZZOZCLChPiR w Łodzi w zakresie działalności naukowo-badawczej, a także do zawarcia w roku 2010 partnerskiej umowy zawartej między Katedrą Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ a referencyjnym Laboratorium Biologii Prątka w Łodzi o współpracy w celu optymalizacji procedur badawczych. Włączając się w nurt badań związanych z diagnostyką zakażeń gruźliczych wykonano wstępne badania oceniając częstość zakażeń *M.tb* u dzieci i osób dorosłych zamieszkujących region łódzki wykorzystując komercyjny interferonowy test pełnej krwi (IGRA) o nazwie QuantiFERON®-TB Gold In Tube **[publikacje C9, C10, C11]**. Postęp w zakresie niezawodnego diagnozowania zakażeń *M.tb* jest niezwykle ważny szczególnie u dzieci, bowiem żadna z obecnie dostępnych mikrobiologicznych, serologicznych lub genetycznych metod diagnostycznych nie jest wystarczająco dobra do rozpoznawania gruźlicy pediatrycznej. Brak szybkiej diagnozy stwarza poważne konsekwencje, gdyż u dzieci rozwój aktywnej choroby może następować szybciej niż u dorosłych, często w ciągu dwóch lat od zakażenia, a niekiedy bezpośrednio po nim. Zakażone *M.tb* dzieci, jeśli nie zachorują, stają się przyszłościowym rezerwuarem wirulentnych bakterii w środowisku, pozostając w stanie utajonego zakażenia *M.tb*. Oceniając produkcję IFN- γ w stymulowanych specyficznymi antygenami *M.tb* hodowlach pełnej krwi u 87 dzieci pozostających w kontakcie rodzinnym z chorymi na gruźlicę płuc obserwowano występowanie dodatnich wyników IGRA u 17 (19%) spośród nich. Brak nieokreślonych wyników testu w tej grupie badanej wskazywało na brak ograniczeń odnośnie wieku pacjentów poddawanych badaniu interferonowym testem pełnej krwi. Wyniki uzyskane w zakresie badań dotyczących oceny profilu cytokinowej odpowiedzi charakteryzującej przeciwaprątkową odpowiedź odpornościową zaprezentowano również w postaci doniesień plakatowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych [doniesienia 14, 31, 39, 40, 61].

Pozostając w nurcie badań zmierzających do opracowania biomarkerów zakażeń *M.tb* nawiązałam współpracę z prof. dr hab. Elżbietą Żądzińską z Katedry Antropologii UŁ wykorzystując własną metodykę LC-MS/MS opartą o wykrywanie kwasów mykolowych ściany komórkowej prątków do badania materiałów pochodzenia archeologicznego **[publikacja C12; doniesienie 28]**. Wykonana analiza LC-MS/MS wykazała obecność w szczątkach kostnych kwasów mykolowych o profilu wykazującym pełną zgodność z profilem tych związków zawartych w ścianie komórkowej wzorcowego szczepu *M.tb* H₃₇R_v. Obecność *M.tb* w badanym materiale została również potwierdzona analizą

genetyczną aDNA opartą o wykorzystanie sekwencji insercyjnej IS6110. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania metody LC-MS/MS w identyfikacji zakażeń prątkowych w materiale pradziejowym.

Inny aspekt prac związany z prątkami reprezentują badania, w których porównano wirulencję klinicznych izolatów *M.tb* występujących w województwie łódzkim oceniając wrażliwość szczepów prątków na różne stężenia defensyny HNP-1, przeżywalność w makrofagach linii komórkowej THP-1 oraz intensywność produkcji IL-12 oraz NO przez zakażane prątkami makrofagi wysięku otrzewnowego myszy [**publikacja B3**, doniesienie 32]. Natomiast starając się lepiej zrozumieć mechanizmy umożliwiające prątkom gruźlicy przetrwanie wewnątrz komórek jednojądrzastych fagocytów wykorzystano dwa mutanty *M.tb*, z których jeden posiadał podwyższony poziom regulatorowego białka mtrA (szczep Rv-78), a drugi wykazywał podwyższony poziom białka regulatorowego z defektem w zakresie fosforylacji (szczep Rv-129). W badaniach wykazano, że oba szczepy prątków podobnie obniżały ekspresję cząsteczek MHC klasy II na ludzkich monocytach, a także w porównywalny sposób wzbudzały ekspresję genu kodującego katepsynę G (*catG*) w infekowanych ludzkich monocytach krwi obwodowej oraz linii komórkowej THP-1. Stymulacja jednojądrzastych monocytów krwi obwodowej żywymi prątkami obu szczepów prowadziła do wzrostu produkcji IL-10, ale nie do indukcji wydzielania IL-12 oraz tlenu azotu. Posługując się techniką mikroskopii konfokalnej zaobserwowano, że w komórkach linii makrofagowej THP-1 fagosomy z mutantem Rv-78 podlegały częstszej kolokalizacji z markerem Rab7, co było dowodem na to, że zwiększona ekspresja białka MtrA zmniejsza zdolność *M.tb* do ograniczenia dojrzewania fagosomów, czego konsekwencją może być zmniejszone przeżywanie takiego szczepu w fagocytach [**publikacja B2**]. Biorąc pod uwagę ważną rolę genu *lysX* odpowiedzialnego za przyłączanie lizyny do fosfatydyloinozytolu w wewnątrzkomórkowym przeżywaniu *M.tb* w badaniach oceniono konsekwencje delecji tego genu na wzrost prątków w fagocytach. Pozbawienie *M.tb* genu *lysX* skutkujące zaburzeniem stosunku lipidów obdarzonych ładunkiem ujemnym i dodatnim prowadziło do nasilenia produkcji TNF- α i IL-6, ale nie IL-10 przez monocyty krwi obwodowej. W monocytach infekowanych *M.tb* z defektem w zakresie genu *lysX* lub szczepem komplementarnym nie obserwowano żadnych zmian w ekspresji cząsteczek MHC klasy II oraz produkcji indukowalnej syntazy tlenu azotu, ale stwierdzono zintensyfikowaną ekspresję genu kodującego katepsynę G w fagocytach zakażanych mutantem *M.tb* *lysX* [**publikacja B4**, doniesienie 58].

Główny obszar moich zainteresowań odzwierciedlają również poświęcone mykobakteriom publikacje pogładowe, których jestem współautorką. Jedna z nich dotyczy zagadnień związanych z przeciwpątkową szczepionką BCG, w tym również strategii opracowywania nowych profilaktycznych szczepionek przeciwgruźliczych [**publikacja B8**], druga związana jest z charakterystyką prątków niegruźliczych – *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi* oraz zmian klinicznych przez nie wywoływanych [**publikacja B7**]. W innej publikacji przeglądowej skupiłam swą uwagę na roli receptora TLR11 w wiązaniu profiliny i flageliny przedstawiając różne aspekty interakcji tego receptora ze specyficznymi

dla niego ligandami, a w jeszcze innej rozszerzyłam zagadnienia związane z kwasami mikołowymi [publikacja C13; B10].

Prątki to nie jedyne drobnoustroje będące przyczyną infekcji o przetrwałym charakterze. Innym przykładem mikroorganizmów zdolnych do wywoływania w organizmie gospodarza długotrwałego zapalenia są pałeczki *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Włączając się w badania prowadzone przez zespół prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk-Chmieli z Pracowni Gastroimmunologii UŁ podejmowane w celu określenia humoralnych parametrów immunologicznych charakteryzujących stan zakażenia *H. pylori* wykazano, że LPS tych bakterii może być rozpatrywany jako jeden z czynników ryzyka wystąpienia niedokrwiennej choroby serca za względu na nadprodukcję przeciwciał przeciwko powierzchniowym antygenom *H. pylori*, nadprodukcję przeciwciał klasy IgG przeciwko determinantom Lewis XY obecnym w lipopolisacharydzie wielu szczepów tych bakterii, a także zawyżonego poziomu sCD14 i LBP (ang. *lipopolysaccharide-binding protein*), białek uczestniczących w interakcji LPS z makrofagami [publikacja C1, publikacja C3]. Kontynuując badania w zakresie interakcji pałeczek *H. pylori* z komórkami gospodarza wykazano, że rozpoznawanie determinantów Lewis XY przez receptory DC-SIGN (ang. *dendritic cell specific ICAM grabbing nonintegrin*) było zależne od obecności fukozy, podczas gdy wiązanie struktur nie zawierających antygenów Lewis było uzależnione od występowania galaktozy [publikacja B1]. Natomiast oceniając podłoże molekularne reakcji odpornościowych wzbudzanych przez *H. pylori* w chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy wykazano występowanie zależności pomiędzy polimorfizmem genu kodującego receptor CD14 (*cd14-159C/T*), który wiąże bakteryjny lipopolisacharyd a występowaniem chronicznej dyspepsji u pacjentów zakażonych *H. pylori* [publikacja C5]. W przeciwieństwie do zakażeń wywoływanych przez *M.tb* w surowicach pacjentów z przewlekłą dyspepsją nie udokumentowano wzrostu stężenia rozpuszczalnej formy receptora CD14 (sCD14) w porównaniu do poziomu obserwowanego u osób zdrowych. Uzyskane wyniki dotyczące oceny parametrów odpornościowych zakażeń wywoływanych przez *H. pylori* przedstawiono również na 4 krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych [doniesienie 17, 43, 45, 52].

II.3. Dalsze plany badawcze

Głównym nurtem moich zainteresowań badawczych pozostaną mechanizmy wzbudzonej przez prątki odpowiedzi odpornościowej, które wyróżniają aktywne i latentne zakażenie *M.tb* i pomagają zrozumieć molekularne tło utrzymujące prątki gruźlicy w stanie uśpienia. Szczególną uwagę zamierzam zwrócić na, nasilającą rozwój przeciwprątkowej odpowiedzi typu Th1, IL-18, będąc aktualnie wykonawcą projektu badawczego finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (2013/11/B/NZ6/01304) „Immunologiczne podstawy udziału IL-18 w odpowiedzi komórkowej na *Mycobacterium bovis* BCG u myszy z obniżoną odpornością i immunokompetentnych” (2014-2017). Spodziewane wyniki projektu poszerzą wiedzę na temat roli IL-18 w interakcjach gospodarz-prątki, szczególnie tych ułatwiających usuwanie bakterii we wczesnym i późniejszym etapie po ekspozycji, a

także zweryfikują hipotezę o możliwości potencjalnego wykorzystania IL-18 w ograniczaniu reaktywacji latentnych zakażeń *M.tb*.

Ciągły niedosyt wiedzy o markerach przeciwpółkowej odpowiedzi odpornościowej skłania do podejmowania badań, które pozwolą na identyfikację parametrów, pochodzących zarówno z komórek wirulentnych prątków, jak i gospodarza, decydujących o przebiegu zakażenia *M.tb* i ewentualnym rozwoju gruźlicy. Postęp w zakresie niezawodnego diagnozowania i opracowaniu krótkich, dobrze tolerowanych schematów terapeutycznych do stosowania w aktywnych i latentnych zakażeniach *M.tb*, jest szczególnie niezbędny dla pokonania problemu gruźlicy pediatrycznej. Temu problemowi zamierzam poświęcić szczególnie swoją uwagę planując wykorzystanie najnowocześniejszych trendów i technik badawczych do wyznaczenia biomarkerów przeciwgruźliczej odporności protekcyjnej oraz przeciwnie mierzalnych wskaźników aktywnej gruźlicy u dzieci. Biorąc pod uwagę złożoność interakcji *M.tb* z organizmem człowieka, zwłaszcza dziecka podlegającego fizjologicznemu rozwojowi, zaplanowane badania będą miały charakter wielopłaszczyznowy. W celu zbadania zależności pomiędzy parametrami charakteryzującymi aktywność komórek odpornościowych oraz profilem metabolicznym i komponentami mykobakterii uwalnianymi z zakażających prątków w aktywnej TB i latentnym zakażeniu *M.tb*, randomizowanemu profilowaniu metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas poddanych zostanie kilkaset biologicznych molekuł zawartych w surowicy oraz hodowlach pełnej krwi stymulowanych specyficznymi antygenami *M.tb*. Jednocześnie w tych samych próbkach materiału oznaczone zostanie stężenie kilkudziesięciu cytokin regulatorowych i prozapalnych przy użyciu techniki Luminex. Zidentyfikowane markery odporności, metabolity i komponenty prątków mogą dostarczyć wiedzy o potencjalnych biomarkerach, które mogą usprawnić i przyspieszyć obecnie tak niedoskonałe wykrywanie aktywnej gruźlicy u dzieci i prognozowanie progresji zakażenia latentnego w aktywną chorobę.

Magdalena Dmura-Cypryńska
.....
podpis