

Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

Łódź dnia 21.04.2020r.

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki, Instytut Mikrobiologii Biotechnologii i Immunologii

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, ul. Banacha 12/16

90-237 Łódź, Tel: (42) 6354186, e. mail: magdalena.chmiela@biol.uni.lodz.pl

Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

Instytutu Biologii Medycznej

Polskiej Akademii Nauk

93-232 Łódź, ul. Lodowa 106

## OCENA

### **Rozprawy doktorskiej mgr Anny Sokołowskiej pt. „Wybrane czynniki odporności wrodzonej u osób chorych na gruźlicę płuc”**

Celem pracy doktorskiej była ocena stężenia w surowicy wybranych rozpuszczalnych mediatorów wrodzonej odporności makroorganizmu oraz ich zmienności na poziomie molekularnym u pacjentów z gruźlicą, z potwierdzonym zakażeniem *Mycobacterium tuberculosis*, w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych. Cel ten był realizowany poprzez ocenę stężenia w surowicy lektyny wiążącej mannozę (MBL), białek surfaktantu płucnego A oraz D (SP-A i SP-D), fikoliny - 1, - 2 oraz -3, a także zdolności kompleksów MBL z proteazami serynowymi MASP do aktywacji dopełniacza. Na poziomie molekularnym badano polimorfizmy i/lub mutacje genów kodujących powyższe mediatory jak również receptory Toll-podobne: TLR-1, -2, -4 i -6, a także białko adaptorowe TIRAP ścieżki sygnałowej inicjowanej za pośrednictwem tych receptorów.

Gruźlica wciąż stanowi poważny problem medyczny i społeczny. Jest to silnie zakaźna choroba przewlekła, często o ciężkim przebiegu, z powodu której rocznie na świecie umiera ponad milion osób. Od wrodzonych mechanizmów odpornościowych zależy czy zakażenie zostanie wyeliminowane na wczesnym etapie, czy przyjmie formę utajoną, czy dojdzie do rozwoju pierwotnej choroby objawowej lub rozwoju gruźlicy wtórnej. Opierając się na powyższych przesłankach Doktorantka włączyła się w swojej pracy doktorskiej w nurt badań, szeroko prowadzonych na świecie, mających na celu poszukiwanie wyznaczników odporności wrodzonej umożliwiających określenie podatności na zakażenie, a także potencjalnych markerów diagnostycznych przydatnych w wykryciu zakażenia. Oczekuje się, że wskazanie takich biomarkerów pozwoliłoby wcześniej zidentyfikować zakażenie prątkami gruźlicy, co umożliwiłoby szybkie wprowadzenie leczenia farmakologicznego i zwiększenie jego skuteczności.

Autorka podkreśliła, że w kontekście gruźlicy jednym z kluczowych komponentów odporności wrodzonej są makrofagi. Ich aktywność fagocytarna zależy od rozpuszczalnych mediatorów m.in. aktywnych podjednostek dopełniacza, kolektyn, w tym lektyny wiążącej mannozę (MBL) aktywującej dopełniacz w powiązaniu z proteazami serynowymi (MASP), białka surfaktantu płucnego A (SP-A) i D (SP-D), a także fikoliny. Makrofagi rozpoznają czynniki zakaźne m.in. za pośrednictwem receptorów typu Toll, a w przekazywaniu sygnałów za pośrednictwem tych receptorów bierze udział białko

adaptorowe TIRAP. Powyższe komponenty są kluczowe dla inicjacji i przebiegu procesu fagocytozy, jako mechanizmu efektorowego umożliwiającego eliminację czynników zakaźnych. Jednak w kontekście gruźlicy są to również czynniki wykorzystywane przez prątki *Mycobacterium tuberculosis* do wnikania tych bakterii do makrofagów, w których one bytują i namnażają się inicjując proces chorobowy.

Biorąc pod uwagę znaczenie prątków kwasoodpornych *Mycobacterium tuberculosis*, jako czynnika etiologicznego gruźlicy, która stanowi poważny problem medyczny i społeczny w Polsce i na świecie, uważam cel pracy za uzasadniony. Podjęte przez Autorkę badania, zmierzające do wskazania elementów odporności wrodzonej determinujących podatność osobniczą na gruźlicę płuc, są ważne ponieważ wiedza w tym zakresie może okazać się przydatna w szybkim wykrywaniu zakażenia, przewidywaniu jego przebiegu, a także być może opracowaniu tzw. personalizowanej terapii. Szczególnie duży nacisk kładzie się obecnie na identyfikację osób zakażonych prątkami gruźlicy w sposób bezobjawowy, u których gruźlica występuje w formie latentnej. Osoby z taką postacią gruźlicy, w środowisku społecznym stanowią poważne zagrożenie związane z możliwością szerzenia się zakażenia.

Praca została przygotowana w formie monografii według schematu typowego dla prac doświadczalnych. Wytlumaczenie koncepcji badań zostało poprzedzone rozbudowanym wstępem teoretycznym, w którym Autorka przedstawiła sytuację epidemiologiczną dotyczącą gruźlicy w Polsce i na świecie, scharakteryzowała czynnik etiologiczny, opisała przebieg zakażenia i interakcje prątków gruźlicy z komponentami układu odpornościowego gospodarza prezentując m.in. zwięzłą charakterystykę wybranych rozpuszczalnych komponentów odpowiedzi nieswoistej jakimi są kolektyny, fikoliny, proteazy serynowe związane MBL lub fikolinami, a także białka układu dopełniacza. Opisała również grupę receptorów Toll-podobnych oraz najważniejsze szlaki sygnałowe z ich udziałem. Przedstawiła również polimorfizmy genów kodujących poszczególne rozpuszczalne białka lub receptory Toll, co jest istotne w kontekście oceny przez Doktorantkę wybranych polimorfizmów tych genów, jako podłoża osobniczej podatności na gruźlicę. Dobrze opracowany wstęp stanowi szerokie i dobre wprowadzenie do podjętych w pracy badań eksperymentalnych.

**We wstępie Autorka zasygnalizowała, że zidentyfikowano już liczne struktury na powierzchni *Mycobacterium tuberculosis*, które są rozpoznawane przez badane przez Nią komponenty odporności nieswoistej gospodarza. Prosiłabym Doktorantkę o podanie przykładów takich interakcji oraz czy wiadomo jakie jest ich znaczenie w eliminacji lub przeciwnie utrwaleniu zakażenia.**

Rozdział Materiał i metody został opracowany bardzo starannie. Wszystkie stosowane w pracy procedury zostały opisane wystarczająco szczegółowo. Na podkreślenie zasługuje umiejętność posługiwania się przez Doktorantkę zarówno technikami immunologicznymi, jak i molekularnymi, w zakresie badania polimorfizmów oraz mutacji wybranych genów. Zastrzeżeń nie budzi również przyjęty przez Autorkę sposób analizy statystycznej wyników. Na podkreślenie zasługuje umiejętność prowadzenia przez Doktorantkę współpracy z wybranymi krajowymi jednostkami służby zdrowia oraz palcówkami badawczymi, w celu pozyskania szczepów bakteryjnych oraz materiału biologicznego do badań, pochodzącego od pacjentów z gruźlicą lub osób zdrowych.



**Drobna uwaga do części Materiały i metody. Standardowo dane dotyczące źródła stosowanych odczynników i materiałów powinny zawierać: nazwę producenta, miasto oraz państwo, a w przypadku USA także stan.**

Grupę badaną stanowili pacjenci z objawami gruźlicy objęci opieką medyczną w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Wojewódzkim Szpitalu Chorób Płuc w Jaroszowcu, Mazowieckim Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruźlicy w Otwocku, Podkarpackim Centrum Chorób Płuc w Rzeszowie oraz Kujawsko-Pomorskim Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy. Zakażenie potwierdzano metodami bakteriologicznymi oraz metodą radiologiczną. W niektórych badaniach uwzględniono grupę pacjentów przed i po leczeniu farmakologicznym. Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe selekcjonowane na podstawie wywiadu medycznego. U pacjentów z gruźlicą i osób zdrowych prowadzono analizę molekularną na DNA izolowanym z leukocytów krwi obwodowej. Natomiast surowicę stosowano do oznaczania stężenia i aktywności wybranych białek.

**W pracy nie zamieszczono nazw właściwych komisji etycznych oraz numeru/ów zgód na wykonanie badań na ludzkim materiale biologicznym. Należy sądzić, iż uprawnienia takie otrzymały współpracujące jednostki medyczne. Bardzo proszę Doktorantkę o dodatkowe wyjaśnienie.**

**O ile w rozdziale 4.1.1. Grupy: badana i kontrola, podano jakie jednostki medyczne były odpowiedzialne za rekrutację pacjentów, to brakuje informacji, jakie podmioty klasyfikowały osoby z grupy kontrolnej. Bardzo proszę Doktorantkę o uzupełnienie tych danych.**

Wyniki badań, z podziałem na poszczególne zadania, zostały opisane w rozdziale 5 i zobrazowane w formie rycin i dokumentacji tabelarycznej z uwzględnieniem wyników analizy statystycznej.

**Opis wyników obejmuje:**

1. Charakterystykę grup badanych.
2. Ocenę stężenia lektyny wiążącej mannozę w surowicy, polimorfizmów genu *MBL2* w eksonie 1 (polimorfizm A/B w kodonie 54, polimorfizm A/C w kodonie 57, polimorfizm A/D w kodonie 52) i w regionie promotorowym (w pozycjach -550 H/L i -221 Y/Y) oraz wpływu tych polimorfizmów na koncentrację MBL.
3. Ocenę zmian stężenia MBL podczas leczenia.
4. Badanie zdolności kompleksów MBL z proteazą serynową MASP-1 do aktywacji dopełniacza, a także ocenę wpływu polimorfizmów genu *MBL2* oraz mutacji genu *MASP2* (w pozycji +359A>G) na aktywność takich kompleksów.
5. Ocenę stężenia kolektyny surfaktantu płucnego D (SP-D) w surowicy oraz wpływu badanych polimorfizmów genu *SFTPD* (w pozycji +32T>C, +478A>G, +868T>A) na stężenie tego białka.
6. Badanie polimorfizmów genów kodujących kolektyny surfaktantu płucnego SP-A1 i SP-A2, odpowiednio genu *SFPA1* (w pozycjach +56T>C, +148G>C, +655C>T) oraz *SFPA2* (w pozycjach +26 C>A, +271 G>C, +667C>A) i wpływu tych polimorfizmów na stężenie powyższych surfaktantów.

7. Ocenę stężenia fikoliny -1 w surowicy, przed i w trakcie leczenia, oraz polimorfizmów genu *FCN1* (w pozycji -542G>A i -144C>A) i ich wpływu na stężenie surowiczej fikoliny-1.
8. Ocenę stężenia fikoliny-2 w surowicy, przed i w trakcie leczenia, oraz polimorfizmów genu *FCN2* (w pozycji -64A>C, -4A>G) i ich wpływu na stężenie surowiczej fikoliny-2.
9. Ocenę stężenia fikoliny-3 w surowicy, przed i w trakcie leczenia, ocenę mutacji +1637delC genu *FCN3* oraz jej wpływu na stężenie surowiczej fikoliny-3.
10. Ocenę przydatności diagnostycznej ilościowego oznaczania badanych białek.
11. Badanie polimorfizmów genów kodujących receptory Toll-podobne: *TLR-1* (w pozycji +1805 T>G), *TLR-2* (w pozycji +2258G>A), *TLR-4* (w pozycji +896 A>G), *TLR-6* (w pozycji +745 C>T) oraz genu *TIRAP* (w pozycji +975 C>T) kodującego białko adaptorowe TIRAP.

Zamieszczony w pracy opis wyników oraz sposób ich prezentacji w formie tabel i wykresów z uwzględnieniem wyników dla poszczególnych pacjentów nie budzą zastrzeżeń, są dobrze przemyślane i czytelnie zobrazowane. Do analizy wyników Autorka wykorzystała właściwe metody statystyczne. Na podkreślenie zasługuje dojrzałe poprowadzona dyskusja połączona z interpretacją uzyskanych wyników. Pod względem edytorskim praca została przygotowana bardzo starannie.

**Autorka uzyskała wiele wartościowych wyników w zakresie oceny stężenia rozpuszczalnych mediatorów nieswoistej odpowiedzi odpornościowej gospodarza. Do najważniejszych należy zaliczyć:**

Wykazanie, iż stężenie lektyny wiążącej mannozę oraz aktywność kompleksów MBL z proteazami serynowymi MASP były istotnie wyższe u pacjentów z gruźlicą, zwłaszcza u mężczyzn, niż u osób grupy kontrolnej. Ponadto stężenia MBL, ale nie innych białek, były wyższe u pacjentów po podjęciu leczenia, niż przed leczeniem. **W tym miejscu chciałabym zapytać Doktorantkę czym Jej zdaniem może to być spowodowane? Ponadto jak wytłumaczyć silniejszą odpowiedź w zakresie wytwarzania MBL u mężczyzn niż u kobiet?**

Odnosnie pozostałych markerów, wykazano istotnie wyższe stężenie surfaktantu płucnego SP-D oraz fikoliny-1 w surowicy pacjentów z potwierdzonym zakażeniem *M. tuberculosis*, zwłaszcza u mężczyzn, w odniesieniu do osób zdrowych. Dla porównania, stężenie fikoliny - 2 w surowicy pacjentów było niższe niż w grupie kontrolnej. **Niezwykle cenna jest sugestia Doktorantki zakładająca możliwość wykorzystania oznaczania stężenia fikoliny-1 oraz fikoliny-2 w różnicowaniu chorych na gruźlicę i osób zdrowych. Jakkolwiek, podobnie jak wobec wyników dotyczących stężenia MBL, nasuwa się pytanie czym mogą być spowodowane wykazane różnice?**

**W części dotyczącej badań molekularnych za najistotniejsze należy uznać:**

- Wykazanie częstszego występowania u osób zdrowych, niż u pacjentów z gruźlicą, genotypu A/A w pozycjach +26(C>A) oraz +667(C>A) genu kodującego kolektynę surfaktantu płucnego *SFTPA2* (*SFTPA2*), a także genotypu A/G w pozycji -4A>G genu fikoliny-2 (*FCN2*).
- Wykazanie częstszego występowania u pacjentów z gruźlicą, niż u osób zdrowych, genotypów G/G i C/C w pozycjach -542 i -144 genu fikoliny-1 (*FCN1*).



- Wykazanie braku różnic, pomiędzy pacjentami z gruźlicą a osobami zdrowymi, w częstości wariantów polimorficznych i/lub mutacji w genie lektyny wiążącej mannozę (*MBL2*), proteazy serynowej *MASP-2* (*MASP-2*), kolektyny surfaktantu płucnego *SP-A1* (*SFTPA1*), surfaktantu płucnego *SP-D* (*SFTPD*), ficoliny-3 (*FCN3*), a także genach kodujących receptory TLR (*TLR1*, *TLR2*, *TLR4* i *TLR6*) lub białko sygnałowe *TIRAP*.

Uzyskane wyniki badań Doktorantka poddała wnikliwej dyskusji, odnosząc je do wyników badań innych autorów. Podjęła także próbę ich interpretacji w kontekście efektów biologicznych. Ta część pracy wskazuje na duże rozeznanie Autorki w dostępnej literaturze, w zakresie tematu badań oraz umiejętność wyciągania wniosków wynikających z przeprowadzonych oznaczeń.

Zdaniem Autorki wysokie stężenie *MBL*, kolektyny *SP-D* i ficoliny-1 u pacjentów z gruźlicą wskazuje na udział tych białek w zakażeniu i przebiegu choroby. Z drugiej strony Doktorantka podkreśla, że są to białka fazy ostrej, w związku z czym nasilenie ich wytwarzania jest przypuszczalnie reakcją organizmu gospodarza na zakażenie. **Wiadomo, że wytwarzanie tych białek jest związane z nasileniem reakcji zapalnej i sygnalizacją cytokinową m.in. zależną od IL-6. Czy taka zależność u pacjentów z gruźlicą występuje?** Autorka sugeruje, że wysokie stężenia *MBL* i kolektyny *SP-D* w surowicy pacjentów z gruźlicą, mimo braku różnic w częstości występowania badanych wariantów polimorficznych pomiędzy pacjentami a osobami zdrowymi, mogą wskazywać na regulację wytwarzania tych białek przez inne niebadane w pracy polimorfizmy. **Proszę Doktorantkę o komentarz, czy jakieś konkretne warianty polimorficzne są szczególnie rozważane ?**

**W jednym z wniosków Autorka podkreśla, że różnice w częstości występowania genotypu A/A polimorfizmów w pozycjach +26C>A i +667 C>A genu kodującego białko surfaktantu płucnego A2 (*SFTPA2*), pomiędzy osobami zakażonymi a zdrowymi, potwierdzają wpływ tego białka na rozwój zakażenia prątkami gruźlicy. Czy wiadomo na czym to działanie polega?**

Na zakończenie moich uwag odnoszących się do analizy wyników i bardzo ciekawej dyskusji chciałabym aby Doktorantka wyjaśniła czy próbowała zestawić uzyskane wyniki w taki sposób aby dla każdego pacjenta lub osoby zdrowej określić profil wariantów polimorficznych badanych genów. Czy w literaturze takie zestawienia są dostępne i analizowane w kontekście „lepszej” lub „słabszej” skuteczności odpowiedzi odpornościowej i podatności na gruźlicę. Ewentualnie, jakie wnioski wynikają z takich zestawień?

Autorka reasumuje, że wiele ośrodków badawczych na świecie prowadzi badania, które jak się oczekuje pozwolą odpowiedzieć na pytanie czy na poziomie mechanizmów odporności nieswoistej występuje podatność osobnicza na zakażenie prątkami gruźlicy i rozwój choroby. Wyniki tych badań wciąż są niejednoznaczne. Czy wiadomo z czego to wynika, czy można zaplanować badania w taki sposób i ewentualnie z wykorzystaniem jakich modeli, które pozwoliłyby odpowiedzieć jednoznacznie na postawione pytanie?

Podsumowując, wyniki zaprezentowane w pracy są źródłem wielu cennych danych dotyczących wybranych białek fazy ostrej, w zakresie ich stężenia w surowicy lub analizy wariantów polimorficznych i/lub mutacji występujących w kodujących je genach, a także możliwości wykorzystania tych danych do oceny podatności osobniczej na zakażenie prątkami gruźlicy i rozwój choroby. Może to mieć istotne znaczenie w przewidywaniu przebiegu choroby, wyboru

postępowania leczniczego i w przyszłości także immunoprofilaktyki. Ponadto uzyskane wyniki stanowią ważne osiągnięcie w zakresie poszukiwania biomarkerów o potencjale diagnostycznym.

Uzyskane w pracy wyniki mają dużą wartość poznawczą i potencjalnie aplikacyjną. Moim zdaniem badania powinny być kontynuowane w celu wyznaczenia zestawu wariantów molekularnych determinujących podatność na zakażenie prątkami gruźlicy i rozwój choroby.

W mojej ocenie na podkreślenie zasługuje bardzo dobre opanowanie przez Doktorantkę technik badawczych stosowanych do oceny wariantów polimorficznych genów.

Wysiętek podjęty przez Doktorantkę i jego efekt w formie przygotowanej rozprawy doktorskiej upoważniają mnie do przedłożenia Radzie Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN wniosku o dopuszczenie Pani mgr Anny Sokołowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Sokołowskiej spełnia wszelkie kryteria stawiane rozprawom na stopień doktora, zgodnie z obowiązującą Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Szeroki zakres przeprowadzonych badań, ich wnikliwa analiza i wysiętek włożony przez Doktorantkę w interpretację wyników upoważniają mnie do wystąpienia do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Anny Sokołowskiej stosowną nagrodą.

Z wyrazami szacunku,

Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

