

**Prof. dr hab. med. Kazimierz Madaliński**  
**ul. Pożaryskiego 23 m 21, 04-703 Warszawa**

**Warszawa, 25.04.2020**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Sokołowskiej**  
**pt. Wybrane czynniki odporności wrodzonej**  
**u osób chorych na gruźlicę płuc**

Odpowiedz wrodzona człowieka jest starsza pod względem filogenetycznym od odpowiedzi nabytej. Między tym 2 rodzajami odporności istnieją istotne różnice: przede wszystkim odporność wrodzona nie wymaga uprzedniego przygotowania i jest od razu gotowa do ataku na obcy, niebezpieczny drobnoustrój. Natomiast odporność nabyta wymaga uprzedniego 'uczulenia' antygenem, by mogła wykazać pełnię swych możliwości. Te podstawowe różnice nie przeszkadzają jednak, by oba rodzaje odporności współpracowały zgodnie w zwalczaniu patogenów.

Klasycznym przykładem etapu rozwojowego, w którym dominuje odporność wrodzona, jest organizm noworodka; w ciągu następnej dekady życia rozwija się odporność nabyta.

W przedstawionej pracy doktorskiej zbadano w przebiegu zakażenia prątkiem gruźlicy białka reprezentujące odporność wrodzoną, by zbadać ich wpływ na rozwój zakażenia. Były to: kolektyny, fikoliny, surfaktant płucny, białko wiążące mannoze (MBL) oraz jego pochodne z MASP-1 i MASP-2, TIRAP, receptory TLR i dopełniacz. Całość badań została opisana na 243 str. komputerowego maszynopisu, w tym streszczenie polskie i angielskie, Wstęp, zakończony celem pracy (53 str.), Materiał i Metody (30 s.), Wyniki (79 s.), Dyskusja (17 s.), Podsumowanie i Wnioski (4 s.) oraz Literatura przedmiotu (431 poz.). Włączono także wykaz publikacji i komunikatów związanych z rozprawą doktorską i pozostałych publikacji i komunikatów.

W obszernym Wstępie omówiono najpierw sytuację epidemiologiczną gruźlicy w Polsce i na świecie, czynnik etiologiczny choroby - *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) oraz przebieg zakażenia gruźliczego. Szczególną uwagę poświęcono interakcji układu odpornościowego z Mtb. Następnie, w sposób szczegółowy przedstawiono białka odporności wrodzonej - kolektyny, w tym białko wiążące mannozę (MBL); kolektyny surfaktantu płucnego, oraz fikoliny (-1, -2, -3). Przy każdym z białek omówiono jego strukturę i swoistość, polimorfizm genu oraz znaczenie kliniczne białka. Omówiono też interakcje kolektyn i fikolin ze strukturami powierzchniowymi Mtb.

W dalszym ciągu Wstępu przedstawiono układ dopełniacza i jego drogi aktywacji, dalej - proteazy serynowe związane z MBL i fikolinami (MASP-1, MASP-2) oraz pokrewne, np. MAp44, jako produkt genu *MASP2*. W końcowej części Wstępu omówiono klasyczne elementy odporności wrodzonej, jak receptory Toll-podobne i ich udział w odpowiedzi p-prątkowej. Przedstawiono polimorfizmy genów kodujących TLR oraz genu kodującego białko adaptorowe TIRAP.

Wstęp pracy został przedstawiony przez Doktorantkę b. kompetentnie, podobnie jak Cel pracy i sposoby jego realizacji.

Dział Materiał i Metody rozpoczyna się od przedstawienia badanych grup osób - 1. chorych na gruźlicę (n=434) i miejsc ich hospitalizacji. Druga grupa (kontrolna) liczyła 250 osób. Materiałem do badań były próbki surowicy i DNA z krwi obwodowej. Omówiono także źródła pozostałych materiałów użytych do badań. W dziale 'Metody' przedstawiono ekstrakcję DNA z krwi pełnej; dalej - badania polimorfizmów i mutacji wybranych genów oraz metody immunologiczne wykrywania stężenia i aktywności białek odporności wrodzonej. Całość kończy podrozdział 'Analiza statystyczna wyników'. Dział Materiał i Metody został przedstawiony znakomicie.

Rozdział 'Wyniki' rozpoczyna się od dokładnej charakterystyki grupy badanej i grupy kontrolnej osób - liczebności i średniej wieku. Średnia wieku osób w grupie badanej była znacząco wyższa, niż średnia w grupie kontrolnej ( $p < 0.0001$ ). Następnie omówiono wyniki badań stężenia poszczególnych czynników odporności wrodzonej oraz badań polimorfizmów genów i ich wpływu na stężenie lub aktywność tego czynnika w surowicy. W niektórych przypadkach - lektyna wiążąca mannozę, fikoliny - udało się uchwycić zmiany stężeń (początkowe vs po leczeniu). W przypadku receptorów TLR, z oczywistych względów analizie poddano jedynie polimorfizm genów TLR-1, -2 -6, -4 oraz genu TIRAP.



Uzyskane dane stężeń badanych białek i aktywności kompleksów MBL z proteazami serynowymi (MASP) zostały poddane analizie krzywych ROC (receiver operating curve), co pozwoliło na wykazanie potencjału diagnostycznego tych oznaczeń. Otrzymano następujące wyniki - dwa czynniki odporności wrodzonej: fikolina-1 i fikolina-2 charakteryzowały się wysoką wartością AUC (area under curve - powierzchnia pod krzywą), wynoszącą  $>0.81$ , co wskazywało na ich wysoki potencjał różnicujący chorych na gruźlicę płuc od osób grupy kontrolnej ( $p=0.0001$ ). Na podstawie tych danych wyznaczono wartości graniczne fik-1 i fik-2, które pozwalają na różnicowanie diagnostyczne. Zarówno opis, jak graficzne przedstawienie wyników (które wymagało ogromu pracy) są b. jasne i czytelne. Zauważyłem jednak, że na rycinach 21 i 35 nie oznaczono grupy chorych (TB) i kontrolnej (C).

W Dyskusji, Autorka przypomina rolę prątka gruźlicy w wywoływaniu tej groźnej choroby, która powinna być prawidłowo rozpoznana i leczona, co nie zawsze ma miejsce. Prątki gruźlicy wykształciły szereg mechanizmów unikania odpowiedzi gospodarza, co może prowadzić do przewlekłego zakażenia i rozwoju choroby. Pomyślna interakcja między komórkami odpornościowymi a drobnoustrojami może doprowadzić natomiast do wyeliminowania patogenu.

Dalej, Doktorantka przywołuje Cel pracy, którym była ocena znaczenia czynników odporności wrodzonej w obronie przed zakażeniem Mtb i rozwojem gruźlicy płuc. Na czoło tych czynników wysuwa się lektyna wiążąca mannozę (MBL), dla której wykazano związek między jej niedoborem a nawracającymi zakażeniami. Zwiększa ona stan zapalny i ma działanie immunomodulujące (nasilając fagocytozę). Otrzymane wyniki badań Autorka dyskutuje z danymi z piśmiennictwa. Co do białek surfaktantu SP-A i SP-D, które rozpoznają Mtb, to stężenia SP-D były znacząco wyższe u pacjentów, niż w grupie kontrolnej, co jest zgodne z danymi piśmiennictwa. Dalej, omówiono grupę fikolin (-1, -2, -3), które przypominają kolektyny - mają właściwości opsonizacyjne i aktywują dopełniacz drogą lektynową. Doktorantka podkreśla wykrytą wartość diagnostyczną oznaczeń fikoliny-1 i -2; jest to duże osiągnięcie. Dalsza część dotyczy badań polimorfizmu genów receptorów TLR oraz białka adaptorowego TIRAP. Z tej grupy, ważny jest receptor TLR-2; pełni on kluczową rolę w odporności na zakażenie, czego jednak nie potwierdzono w tej pracy.

Pod koniec Dyskusji, Autorka nawiązała do trudności diagnostyki gruźlicy, zwłaszcza gdy nie ma możliwości wykonania hodowli czynnika etiologicznego. W tej

sytuacji, zaobserwowane podwyższone stężenia fikoliny-1, a obniżone - fikoliny 2 o osób chorych, w porównaniu ze zdrowymi, mogą wskazywać na ich znaczenie jako biomarkerów, pomocnych w rozpoznaniu gruźlicy. Dyskusja wskazuje na inteligencję Autorki i jej zdolności kojarzenia i interpretacji faktów.

Pracę zamykają interesujące Podsumowanie i dobrze sformułowane Wnioski. Rozprawa została napisana prostym, klarownym językiem i pod względem konstrukcji nie budzi zastrzeżeń. Mam jeszcze jedną uwagę: w streszczeniu powinna być podana liczebność grupy chorych na gruźlicę i liczebność grupy kontrolnej

Jako całość, opracowanie stanowiące rozprawę doktorską, robi bardzo pozytywne wrażenie.

Wnoszę więc do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN, ze względu na spełnienie wymogów ustawowych, o dopuszczenie mgr biol. Anny Sokołowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na jej ambicję, na ogrom pracy, który został wykonany i bardzo dokładnie opisany, a także na ostrożne wyciąganie wniosków przez Doktorantkę, wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.

K. Madzińska