

## Streszczenie

Mimo znaczącego postępu w zapobieganiu i leczeniu gruźlicy, choroba ta ciągle pozostaje globalnym problemem zdrowotnym, a corocznie z jej powodu notuje się ponad milion zgonów. Do czynników przyczyniających się do wciąż ograniczonej skuteczności walki z gruźlicą należą, między innymi, niepełny efekt ochronny stosowanej powszechnie szczepionki BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) oraz często przedwczesne przerywanie długotrwałej farmakoterapii przeciwprątkowej. W wielu krajach, w wyniku niewłaściwego nadzoru nad leczeniem, wzrasta odsetek zakażeń prątkami opornymi na liczne antybiotyki. Migracje ludności prowadzą do rozprzestrzeniania się szczepów wielolekoopornych. Diagnostyka gruźlicy opiera się głównie na badaniach mikrobiologicznych oraz radiologicznych. Brakuje swoistych markerów zakażenia, które pozwoliłyby skutecznie rozpoznać chorobę w jej wczesnym etapie i ograniczyć jej rozprzestrzenianie. Nieleczony, prątkujący chory może w ciągu roku zarazić nawet kilkanaście osób, natomiast po włączeniu antybiotykoterapii, niebezpieczeństwo transmisji zakażenia mija już po kilku tygodniach.

Reakcja ochronna organizmu na wnikające patogeny jest natychmiastowa, gdyż już w pierwszym etapie infekcji zostają uruchomione mechanizmy odporności wrodzonej. Jej czynnikami są m.in. receptory PRR (ang. pattern recognition receptors) rozpoznające wzorce strukturalne drobnoustrojów PAMP (ang. pathogen-associated molecular patterns). Występują one w organizmie zarówno w formie związanej z komórkami odpornościowymi, jak i w formie rozpuszczalnej. Przebieg początkowej fazy zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) jest niezwykle istotny. Przy sprawnie działających mechanizmach odporności, w 90-95% przypadków nie dochodzi do rozwoju aktywnej postaci gruźlicy. Oddziaływanie komórek *M. tuberculosis* z różnorodnymi receptorami i uruchomienie procesu fagocytozy pełnią kluczową rolę w przebiegu zakażenia. Efekt oddziaływań patogen-gospodarz często zależy od rodzaju receptora biorącego udział w rozpoznaniu antygenów bakteryjnych.

Celem pracy była ocena znaczenia wybranych czynników odporności wrodzonej w podatności na gruźlicę płuc, której czynnikiem etiologicznym jest *Mycobacterium tuberculosis*.

Do grupy badanej zakwalifikowano pacjentów Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Wojewódzkiego Szpitala Chorób Płuc w Jaroszewcu, Mazowieckiego Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruźlicy w Otwocku, Podkarpackiego Centrum

Chorób Płuc w Rzeszowie oraz Kujawsko-Pomorskiego Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy, u których rozpoznano aktywną gruźlicę płuc wywołaną zakażeniem *M. tuberculosis*. Diagnoza potwierdzana była metodami bakteriologicznymi (hodowla czynnika etiologicznego) oraz za pomocą prześwietlenia klatki piersiowej. Próby krwi (przeznaczone do otrzymania DNA wykorzystywanego w badaniach genetycznych oraz surowicy używanej do oznaczeń stężenia/aktywności białek) pobierano niezwłocznie po stwierdzeniu choroby. Od niewielkiej liczby pacjentów, próby surowicy otrzymano dodatkowo po kilkutygodniowym leczeniu, w celu oceny ewentualnych zmian stężenia badanych czynników. Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe niezgłaszające w wywiadzie przebycia ciężkich/nawracających zakażeń, a także chorób o podłożu autoimmunizacyjnym i nowotworowym.

Aby zrealizować cel pracy, określano stężenia kolektyn [lektyny wiążącej mannozę (MBL) i białka surfaktantu płucnego typu D (SP-D)], aktywność kompleksów MBL z proteazami serynowymi MASP-1 i MASP-2 oraz stężenia fikolin (fikolina-1, -2 i -3) w surowicy. Badano również wybrane polimorfizmy genów kodujących wspomniane wyżej czynniki oraz białko surfaktantu płucnego A (SP-A), a także genów dla wybranych receptorów Toll-podobnych (TLR-1, -2, -4, -6) i białka adaptorowego TIRAP, uczestniczącego w przekazywaniu sygnału z aktywowanych TLR. Oceniano różnice stężeń i aktywności wspomnianych czynników pomiędzy grupami, częstość występowania niskich i wysokich stężeń, wśród osób chorych i niechorujących oraz częstość występowania wariantów polimorficznych wspomnianych genów i ich wpływ na poziom badanych białek w surowicy.

Mediany stężeń MBL i aktywności kompleksów tej lektyny z proteazami serynowymi MASP (MBL-MASP-1 i MBL-MASP-2), jak również stężenia kolektyny surfaktantu płucnego (SP-D) i fikoliny-1 były statystycznie istotnie wyższe w grupie pacjentów, w porównaniu z osobami zakwalifikowanymi do grupy kontrolnej. Różnice te obserwowano niezależnie od płci i wieku. Dodatkowo wykazano, że wśród mężczyzn chorych na gruźlicę, stężenia wymienionych białek i aktywności kompleksów MBL z proteazami MASP były znacząco wyższe niż u chorujących kobiet.

Z drugiej strony, badając polimorfizmy genów *MBL2* oraz *FCN1*, w grupie chorych na gruźlicę, zanotowano odpowiednio: niższą (choć statystycznie nieistotnie) niż w grupie odniesienia częstość występowania genotypów związanych z wysokim stężeniem MBL (YA/YA) i znacząco wyższą częstość występowania genotypów związanych z niskim stężeniem fikoliny-1 (G/G w pozycji -542; C/C w pozycji -144). Może to świadczyć o

wpływie innych, niebadanych w pracy polimorfizmów wspomnianych genów na stężenie ich produktów w surowicy lub czynników pozagenetycznych na wzrost ich ekspresji. Poziom MBL czy fikoliny-1 może także wzrastać w odpowiedzi na aktywne zakażenie. W odróżnieniu od opisanych powyżej białek, wykazano, że mediana stężeń fikoliny-2 w grupie pacjentów, niezależnie od wieku i płci, była istotnie niższa niż w grupie osób zdrowych, natomiast mediany stężeń fikoliny-3 nie różniły się znacząco pomiędzy grupami. Potwierdzono ponadto wcześniejsze doniesienia, że przeciętne stężenie drugiego z wymienionych czynników jest wyższe u mężczyzn niż u kobiet. W przypadku fikoliny-2, badając wybrane polimorfizmy genu kodującego to białko, zaobserwowano, że genotyp A/G w pozycji -4 genu *FCN2*, występował znacząco częściej u osób zdrowych w porównaniu z grupą pacjentów.

Podczas leczenia przeciwgruźliczego, stężenie MBL w surowicy znacznie wzrastało, podczas gdy nie zaobserwowano istotnych różnic w przypadku pozostałych białek (SP-D i fikolin). Analiza krzywych ROC umożliwiła stwierdzenie, że fikolina-1 oraz fikolina-2 charakteryzują się wysokim potencjałem różnicującym osoby chore na gruźlicę płuc od osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej, w związku z czym możliwe jest rozpatrywanie ich jako potencjalnych biomarkerów pomocniczych we wczesnej diagnostyce tej choroby. Wykazano także, że przeprowadzenie analizy dwuczynnikowej z wykorzystaniem stężeń tych białek skutkuje wyższą czułością i swoistością różnicowania.

Zaobserwowane różnice częstości występowania wariantów polimorficznych genu *SFTPA2* w pozycjach +26 (C>A) oraz +667 (C>A) (genotypy A/A występowały znacząco rzadziej w grupie TB niż w grupie C), wydają się potwierdzać znaczenie SP-A w odporności przeciwko *Mtb* i sugerują wpływ wspomnianych polimorfizmów na podatność gospodarza na gruźlicę. Z kolei brak różnic wykazany w analizie polimorfizmów pozostałych genów: *MASP-2*, *SFTPA1*, *SFTPD*, *FCN3*, *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* oraz *TIRAP* sugerują brak ich wpływu na ryzyko rozwoju aktywnego zakażenia.

Przedstawiona praca pozwala na rozszerzenie wiedzy dotyczącej udziału mechanizmów odporności wrodzonej w podatności na zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* i rozwój aktywnej postaci gruźlicy. Uzyskane wyniki wskazują celowość prowadzenia dalszych prac, obejmujących inne polimorfizmy badanych genów, inne czynniki odporności wrodzonej i przeprowadzenie, w uzasadnionych przypadkach, analiz wieloczynnikowych.