



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr. Agnieszki Częścik

p.t.: „Wpływ wirusowo-swoistej stymulacji limfocytów izolowanych od osób szczepionych przeciwko odrze lub po przebytych zakażeniu na odpowiedź immunologiczną *in vitro*”

Przygotowanej pod kierunkiem Promotor dr hab. Joanny Siennickiej,

prof. nadzw. NIZP-PZH

oraz Promotora pomocniczego, dr Agnieszki Trzcińskiej

w Zakładzie Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny

Wirus odry (Measles virus, MeV) należy do rodziny *Paramyxoviridae*, podrodziny *Paramyxovirinae*, rodzaju *Morbillivirus* i jest jedynym przedstawicielem tego rodzaju zakażającym człowieka. Patogen przenosi się drogą kropelkową, a sama odra jest chorobą wysoce zaraźliwą (rozwija się u 75-90% narażonych osób). Przez lata odra była jedną z najpoważniejszych chorób wieku dziecięcego, ze śmiertelnością na poziomie 5-8% przed wprowadzeniem masowych szczepień w drugiej połowie XX w. W Polsce w ostatnich 20-tu latach zanotowano jeden przypadek zgonu z powodu odry (w 1998 roku).

Mimo bliskiego pokrewieństwa z eradykowanym w 2010 roku bydlęcym wirusem wirusem księżosuszu (Rinderpest virus, ReV), wirus odry zakaża wyłącznie człowieka. Paradoksalnie, mimo niezwykle wysokiej zakaźności MeV, cecha ta znacząco może ułatwić jego eliminację ze środowiska, bowiem ludzie, którzy przeszli odrę nie zachorują znowu, co usuwa ich z puli potencjalnych gospodarzy. Najprostszym i najbezpieczniejszym przerwaniem transmisji wirusa w obrębie populacji ludzkiej na całym świecie są zaś masowe szczepienia. Przed

wprowadzeniem na rynek szczepionki przeciwko odrze na początku lat 60-tych XX w. szacuje się, że rocznie na odrę umierało od 7 do 8 milionów dzieci na całym świecie, zaś w 2014 roku liczba ta spadła do 145 tysięcy zgonów. Według doniesień Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) uważa się, że między rokiem 2000 a 2013 szczepienia zapobiegły ponad 15 milionom zgonów, głównie w krajach Trzeciego Świata. W ostatnich latach jednak wirus odry nawraca - na przełomie 2014/2015 odnotowano ponad 90 zachorowań na terenie Kalifornii i 574 przypadki tej choroby w Berlinie (w tym jeden śmiertelny) - w powrocie pomaga mu niestety rosnąca liczba ludzi niezaszczepionych. Wiąże się to głównie z coraz szerszą działalnością ruchów antyszczepionkowych oraz wymiany pseudo-naukowych informacji przez popularne medium, jakim jest Internet. Przeciwnicy szczepień podają powody wyznaniowe oraz światopoglądowe odmawiając zaszczepienia siebie lub dzieci. Ludzie ci wspominają o ograniczaniu wolności i swobód poprzez obowiązek szczepień, przekonują o szkodliwości preparatów szczepionkowych lub ich składników, przeceniają także rolę naturalnej ekspozycji na patogen. Wszystko to powoduje, iż tematyka zakażeń wirusem odry, szczepień profilaktycznych oraz odpowiedzi immunologicznej na infekcję MeV staje się ponownie istotnym problemem.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska liczy 109 stron, w układzie typowym z podziałem na wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, informacje dodatkowe poświęcone źródłom finansowania oraz dorobkowi naukowemu Doktorantki oraz bibliografię. Prócz tego na początku pracy zamieszczono spis treści oraz wykaz stosowanych skrótów, zaś na końcu dysertacji, po piśmiennictwie liczącym 176 pozycji, znalazły się spis 30 rycin i 5 tabel oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

W rozdziale „Wstęp” Autorka przedstawiła zwięzłą charakterystykę wirusa odry, z uwzględnieniem jego cyklu replikacyjnego oraz przebiegu klinicznego zakażenia. W dalszej części znalazł się opis odpowiedzi immunologicznej podczas zakażenia tym patogenem oraz omówienie roli receptorów *Toll-like* (TLR) czy immunosupresyjnego wpływu zakażeń MeV na organizm gospodarza. Istotną część Wstępu stanowią podrozdziały poświęcone swoistej profilaktyce zakażeń wirusem odry za pomocą szczepień czy też roli odpowiedzi poszczepiennej. Na zakończenie Wstępu Autorka opisuje sytuację epidemiologiczną zakażeń MeV w Polsce, z podziałem na okresy przed i po wprowadzeniu szczepień profilaktycznych oraz plany WHO dotyczące eradykacji wirusa odry ze środowiska. Na podkreślenie zasługuje

dobór piśmiennictwa przez Doktorantkę, który jest dobrany w przemyślany sposób i stanowi pełen obraz problematyki zakażeń spowodowanych przez wirusa odry.

Trzy cele pracy zostały sformułowane jasno i klarownie; ponadto opatrzone je krótkim wstępem, który znacząco ułatwia zrozumienie przesłanek podjęcia tej właśnie tematyki badań.

W rozdziale „Materiał i metody” znalazł się drobiazgowy opis materiału klinicznego wykorzystanego do eksperymentów, a grupa badana 55 osób może budzić przekonanie o miarodajności i znamienności statystycznej uzyskanych wyników. Autorka opisała również szczepy wirusa odry użyte jako wzorce, a także zastosowane do ich namnażania linie komórkowe i odczynniki kontrolne. Podobnie dokładnie scharakteryzowano wykorzystane w toku badań metody, które zostały dobrane w sposób absolutnie prawidłowy, umożliwiając w pełni osiągnięcie założonych celów pracy.

W części doświadczalnej Doktorantka określiła poziom specyficznych przeciwciał anti-MeV w klasie IgG u osób z grupy badanej testami immunoenzymatycznymi, następnie dokonując standaryzacji oznaczeń ilościowych z wykorzystaniem międzynarodowego standardu WHO. Oznaczono także odpowiedź immunologiczną u osób z grupy doświadczalnej, badając ilość leukocytów krwi obwodowej, profil limfocytarny oraz poziom cytokin Th1/Th2. W następnej fazie badań określano cytometrycznie częstość występowania aktywowanych limfocytów T CD4⁺ u osób wykazujących różny poziom odpowiedzi humoralnej. Badanie to obwarowane zostało dużą ilością układów kontrolnych, co szczególnie świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Autorki. Techniki biologii molekularnej wykorzystano natomiast do oznaczenia ekspresji receptorów *Toll-like* w mRNA izolowanym z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. Doktorantka posłużyła się tu metodą real-time RT-PCR, z wykorzystaniem kwantyfikacji względnej (*relative quantification*) w odniesieniu do genu kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), jako genu referencyjnego. Na szczególne uznanie zasługuje użycie przez Autorkę specyficznych sond fluorescencyjnych typu TaqMan, zamiast powszechnie stosowanych w podobnych eksperymentach barwników niespecyficznych typu SYBR Green I. Podobnie analiza wyników z wykorzystaniem typowej metody $\Delta\Delta C_t$, ale i metody Pfaffla, świadczy o głębokim zrozumieniu problematyki ilościowego badania ekspresji genów przez Doktorantkę.

W rozdziale „Wyniki” Autorka przedstawiła kryteria doboru oraz charakterystykę osób z grupy badanej, uwzględniając przy tym aspekty istotne z punktu wyznaczonych celów pracy. Obok wyników własnych oznaczeń serologicznych znalazły się tu badania zależności poziomu specyficznych przeciwciał anti-MeV od wieku oraz liczby dawek szczepionki i czasu od ostatniego szczepienia. Kolejnym elementem było przedstawienie wpływu wirusowo-swoistej i wirusowo-nieswoistej stymulacji na częstość występowania aktywowanych limfocytów T CD4⁺ oraz porównanie odpowiedzi komórkowej i humoralnej w próbkach osób dodatnio reagujących na stymulację trzema szczepionkami wirusa odry użytymi w doświadczeniach. Ostatnim elementem rozdziału było wykazanie wpływu stymulacji MeV na ekspresję receptorów *Toll-like* w mRNA izolowanym z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. Tę część Doktorantka przygotowała w mojej opinii ze szczególnie wielką starannością i uwzględniła w niej wszystkie dane istotne dla dalszej interpretacji i wyciągnięcia wniosków, nie pomijając elementów kontroli badań. Forma prezentowania danych w rozdziale „Wyniki” jest przejrzysta, uporządkowana a czytający ma wrażenie, iż wydobyto z nich maksymalną możliwą ilość informacji.

Rozdział „Dyskusja” został przeprowadzony przez mgr. Agnieszkę Częścik przeprowadziła w sposób zasługujący na pełne uznanie. Autorka omówiła uzyskane wyniki w kontekście dostępnych danych literaturowych, zawierając odniesienia do kilku interesujących z mojego punktu widzenia obserwacji, dotyczących przewagi testów EIA/ELISA nad oznaczeniami metodą immunofluorescencyjną czy też testem seroneutralizacji. Uwagę moją, jako osoby zajmującej się zakażeniami wśród ludzi z obniżoną odpornością, zwróciły akapity poświęcone zachorowaniom na odrę wśród osób z udokumentowaną historią szczepień. Skłania to do dyskusji czy przy diagnostyce zakażeń asymptomatycznych w grupie chorych z osłabionym funkcjonowaniem układu odpornościowego - zwłaszcza u pacjentów poddanych silnej immunosupresji - należałoby również zacząć rozważać prowadzenie badań w kierunku wirusa odry. Moim zdaniem rozdział „Dyskusja” objął wszystkie możliwe aspekty zagadnienia, których dotyczyć powinna niniejsza rozprawa. W ramach podsumowania całość pracy opatrzone natomiast czterema w pełni uprawnionymi, logicznie uszeregowanymi wnioskami.

Pragnę nadmienić, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Agnieszki Częścik stanowi poważne wyzwanie dla recenzenta, bowiem napisana

została w sposób niezwykle staranny i precyzyjny. Drobne błędy dostrzeżone w tekście mają głównie charakter edytorski (np. str. 76 – powinno być wysp Marshalla, nie zaś Marschala), a jedynymi ważniejszymi uwagami jakie nasunęły mi się podczas lektury pracy są:

- na dalszym etapie badań warto byłoby wykorzystać techniki biologii molekularnej także do zbadania poziomu ekspresji genów kodujących cytokiny oraz genów kodujące stosowne receptory dla nich w próbkach limfocytów krwi obwodowej
- prócz badania receptorów *Toll-like* występujących na powierzchni komórek należy rozważyć oznaczenie ekspresji podobnych cząstek związanych z błoną endosomów. Wykazano bowiem, że TLR-3 oraz TLR-9 odgrywać mogą istotną rolę w modulowaniu odpowiedzi przeciwwirusowej komórek, poprzez aktywację kinaz serynowo-treoninowych i jądrowego czynnika kappa B (NF-κB).
- w kontekście informacji przedstawionych w rozdziale „Dyskusja” celowym wydaje się badanie polskiej populacji pod kątem polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) w genach kodujących receptory *Toll-like* oraz szlaku kinaz i cząstek sygnałowych.

Uwagi te w najmniejszym stopniu nie wpływają na merytoryczną wartość rozprawy doktorskiej, ani nie obniżają mojej wysokiej oceny jej strony redakcyjnej. Podkreślam ponownie, iż praca ta w mojej opinii została przygotowana z wielką starannością, wyniki są precyzyjnie udokumentowane a wnioski logiczne i w pełni wynikające z treści pracy. Wszystko to składa się na łatwość odbioru zawartych w rozprawie informacji.

Z całym przekonaniem stwierdzam więc, iż w mojej opinii rozprawa doktorska mgr. Agnieszki Częścik spełnia wymogi Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. 2003 nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny o dopuszczenie mgr. Agnieszki Częścik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

T. Dzieciatkowski

dr hab. n. med. Tomasz Dzieciatkowski