



UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
INSTYTUT MIKROBIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

Zakład Wirusologii i Immunologii

Akademicka 19, 20-033 Lublin, fax: (4881) 537 59 59; tel: (4881) 537 59 43

Prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska
Zakład Wirusologii i Immunologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii UMCS

Lublin 21.09.2015

Recenzja

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Częścik
pt.: „Wpływ wirusowo-swoistej stymulacji limfocytów izolowanych od osób
szczepionych przeciwko odrze lub po przebytych zakażeniu
na odpowiedź immunologiczną *in vitro*”**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierownictwem naukowym Pani dr hab. Joanny Siennickiej prof. nadzw. NIZP-PZH w Zakładzie Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Promotorem pomocniczym była Pani dr Agnieszka Trzcńska.

W ocenie NIZP-PZH (<http://szczepienia.pzh.gov.pl/>, 2015) w Polsce przeciwko odrze zaszczepionych jest ponad 95% populacji dzieci i młodzieży. Mimo to, notowany jest niewielki (w porównaniu ze światowym) wzrost liczby zachorowań: w roku 2014 było 110 przypadków - 25 więcej niż w 2013 i o 40 więcej niż w roku 2012. Jak wynika z ryciny 8 przedstawionej przez Doktorantkę we Wstępie pracy, ta wzrostowa tendencja widoczna była już we wcześniejszych latach (2010-2012). Chociaż szczepionka przeciwodroga uważana jest za wysoce skuteczną, to z różnych przyczyn (w większości nieznanych), u niektórych szczepionych nie rozwija się właściwa odpowiedź ochronna. Dlatego istnieje wyraźnie dodatnia korelacja między liczbą zachorowań wśród osób nieszczepionych i szczepionych. Ponieważ człowiek jest jedynym rezerwuarem wirusa odry, dalszy wzrost odsetka osób nieszczepionych oznacza zwiększenie fali zachorowań, także wśród osób zaszczepionych. Z

danych NIZP-PZH wynika, że liczba odmów zaszczepienia dzieci wzrosła z 3 tys. w roku 2011 do 12,7 tys. w 2014.

Wobec powyższych faktów próba znalezienia przyczyny słabej, poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej jest jak najbardziej aktualna – i jest jednym z celów prezentowanej pracy doktorskiej. Z przebiegu odry wiadomo, iż odpowiedni poziom swoistych przeciwciał obniża ryzyko zakażenia, zaś sprawna odpowiedź komórkowa decyduje o eliminacji patogenu. Jednak czy zaszczepione osoby, u których nie rozwinęła się odpowiedź humoralna dysponują pamięcią immunologiczną pozwalającą w przyszłości na skuteczną reakcję przeciw dzikim szczepom wirusa odry? Odpowiedzi na tak postawione pytanie również podjęła się Pani mgr Agnieszka Częścik.

Ocena poprawności struktury rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Częścik ma typowy układ dla pracy eksperymentalnej i mieści się na 109 stronach zawierających: Wstęp, Cel pracy, opis Materiału i Metod, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Piśmiennictwo, Spis rycin i tabel. Pracę rozpoczyna wykaz stosowanych skrótów, zaś kończą - streszczenia w języku polskim i angielskim. Zachowane zostały odpowiednie proporcje między poszczególnymi rozdziałami pracy.

Ocena merytoryczna rozprawy

Na 27 stronach **Wstępu** zawarte są wszystkie niezbędne informacje stanowiące merytoryczną podstawę pracy; charakterystyka wirusa odry, epidemiologia i obraz kliniczny choroby, opis szczepionek. Najszerzej uwzględniona jest odpowiedź immunologiczna, zarówno w przebiegu naturalnego zakażenia jak i poszczepienna. Autorka zwraca tu szczególną uwagę na rolę przeciwciał i odpowiedzi komórkowej (w tym zjawisko polaryzacji i immunosupresję), jak również na udział receptorów *Toll-like* jako pomostu pomiędzy odpowiedzią wrodzoną i nabytą na antygeny wirusa odry. W mojej opinii tak napisany Wstęp stanowi doskonałe wprowadzenie w temat pracy i uzasadnienie prowadzonych dalej badań. Jedna uwaga – brak w tekście odniesienia do ryciny 6.

Cel pracy jasno wyłania się z wprowadzenia i został przedstawiony w postaci trzech szczegółowych zadań.

Rozdział **Materiał i Metody** został opracowany niezwykle starannie w sposób umożliwiający powtórzenie każdego doświadczenia. Znalazł się tu szczegółowy opis (niekiedy z

uzasadnieniem celowości danego eksperymentu) wykonanych badań oraz interpretacji wyników. Na podkreślenie zasługuje fakt umieszczenia strategii barwienia i bramkowania komórek oraz graficznych schematów doświadczeń, dzięki czemu czytający ma od razu pełen obraz (*'big picture'*) badań. Pani mgr Agnieszka Częścik dokumentuje w tym miejscu znajomość wielu technik; umiejętność pracy z hodowlami komórkowymi i wirusami, metod immunoenzymatycznych, cytometrycznych oraz molekularnych. Gwarancją właściwej interpretacji przedstawionych w pracy wyników jest zaplanowanie i wykonanie doświadczeń kontrolnych (np. kontrola *mock*, walidacja metody *real-time* RT-PCR). Dla przedstawionych grup badanych zaproponowano właściwe testy statystyczne. Podsumowując, zaplanowanie badań, ich metodyczne zróżnicowanie oraz sposób przedstawienia wskazuje na dojrzałość i rzetelność naukową Doktorantki. Na str. 42 - schemat doświadczenia kontrolnego - znalazłam umieszczony niepoprawny poziom przeciwciał (zamiast 3 409 mIU/ml powinno figurować 568 mIU/ml).

W omówieniu **Wyników** przyjęty został następujący porządek: (i) dobór i charakterystyka grupy badanej uwzględniająca określenie poziomu przeciwciał anti-MeV w kontekście wieku i liczby dawek szczepionki oraz statusu immunologicznego ochotników, (ii) wirusowo-swoista aktywacja limfocytów T (badanie pamięci immunologicznej), (iii) porównanie odpowiedzi humoralnej i komórkowej oraz (iv) ekspresja receptorów *Toll-like* w mononuklearnych leukocytach stymulowanych MeV. Należy podkreślić, iż przedstawione w pracy wyniki w zdecydowanej części zostały już opublikowane.

W badaniu uczestniczyły trzy grupy ochotników: osoby seropozytywne w wyniku naturalnego zakażenia, seropozytywne w wyniku szczepienia oraz seronegatywne pomimo szczepienia. Co ważne, wszystkie osoby uczestniczące w badaniu cechowały się podobnym profilem immunologicznym. Pani mgr Agnieszka Częścik potwierdziła fakt skuteczniejszej produkcji przeciwciał w odpowiedzi na naturalne zakażenie wirusem odry. Jednocześnie nie odnotowano różnic w poziomie przeciwciał w zależności od liczby dawek szczepionki i czasu jaki upłynął od podania ostatniej dawki (*Rycina 16 i 17*). Zadam przewrotne pytanie – jakie uzasadnienie, w świetle tych wyników, znajduje stosowanie dwóch dawek szczepionki przeciwodrowej? Poziom przeciwciał oznaczany był dwiema metodami; EIA i testem neutralizacji PRNT. Chociaż Autorka wskazuje odpowiadające sobie wartości stężenia przeciwciał wykrytych powyższymi testami, to, jak zauważa w Dyskusji, porównanie wyników uzyskanych różnymi metodami nie jest dopuszczalne. Zmierając ku odpowiedzi na założony Cel pracy Doktorantka badała podatność limfocytów krwi ochotników na aktywację

pod wpływem trzech szczepów wirusa odry; szczepionkowym i dwoma szczepami dzikimi. Przedstawione wyniki są tylko częściowo optymistyczne. Niezależnie bowiem od historii kontaktu z wirusem w każdej grupie znalazły się osoby, których limfocyty nie ulegały aktywacji żadnym z użytych szczepów wirusa odry (tzw. *non-responders*). Mimo to, średni poziom przeciwciał anti-MeV tych osób nie różnił się istotnie w porównaniu z grupą, która odpowiedziała aktywacją limfocytów na wszystkie użyte szczepy wirusa odry. Czy wystąpienie lub brak reakcji komórek CD4 na wirusowo-swoistą stymulację może mieć związek z liczbą przyjętych dawek szczepionki w 2 i 3 grupie ochotników?

Związek pomiędzy receptorami TLR a wirusem odry został dostrzeżony stosunkowo niedawno. Teoretycznie ich aktywacja (TLR2 i TLR4) powinna skutkować uruchomieniem mechanizmów odpowiedzi nabytej, jednak w przypadku odry obserwuje się immunosupresję. Pani mgr Agnieszka Częścik wykazała w swoich badaniach wyższą ekspresję genów TLR2 i TLR4 w leukocytach seronegatywnych osób szczepionych po kontakcie PBMC z dzikimi szczepami wirusa odry. Czy można więc zaryzykować stwierdzenie, iż to właśnie większa podatność leukocytów do ekspresji genów dla tych receptorów ma związek z silniejszą immunosupresją u osób seronegatywnych (*pomimo szczepienia*)? Na str. 55 znajduje się odwołanie do niewłaściwej Ryciny (zamiast 13 powinna być 14).

W sprawie poprowadzonej **Dyskusji** Doktorantka rozważa konsekwencje zarówno nie poddania się szczepieniu przeciwko odrze, braku odpowiedzi na szczepienie, jak i problemu „zanikającej odporności”. Chociaż potwierdza, iż odpowiednio wysokie stężenie przeciwciał jest ważnym wskaźnikiem nabytej odporności, to aby w pełni określić poziom odpowiedzi poszczepiennej wskazany byłby także pomiar odpowiedzi komórkowej. Konkluduje też, iż przyczyna braku odpowiedzi komórkowej wobec szczepów szczepionkowych wirusa odry u osób z niewystarczającym poziomem przeciwciał anti-MeV może tkwić w samej szczepionce. Dyskusja nie jest wolna od uwag własnych, co uważam za duży plus, gdyż świadczy o dużej wiedzy Autorki i krytycznym nastawieniu do uzyskanych wyników. Ta cecha jest bardzo pożądana w pracy naukowej.

Jasno sformułowane **Wnioski** odpowiadają na wyznaczone cele pracy. Za najbardziej interesujące uważam sugestię Doktorantki, iż w pełnej ocenie ochrony przed zakażeniem wirusem odry powinien być rozpatrywany poziom odpowiedzi zarówno humoralnej, jak i komórkowej. Drugim ważnym wnioskiem wynikającym z badań własnych jest wskazanie udziału receptorów *Toll-like* w kształtowaniu poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej.

Bibliografia obejmuje 176 pozycji, w przeważającej części prac anglojęzycznych z okresu 1954-2014. Zdecydowana większość pracy opublikowana została przed rokiem 2010.


Ocena strony edytorskiej rozprawy

Chociaż cała rozprawa napisana została poprawnym językiem, to Doktorantka nie ustrzegła się nielicznych błędów typograficznych i stylistycznych. Pani mgr Agnieszka Częścik dołożyła starań, aby wzbogacić tekst (Wstęp, Materiał i Metody) interesującymi rycinami i schematami. Podział pracy na rozdziały i podrozdziały jest jasny i czytelny, można byłoby jedynie rozważyć przedstawienie w ten sposób Dyskusji – ale nie uważam tego za warunek konieczny.

Podsumowanie recenzji

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi ważne opracowanie dotyczące oceny reaktywności limfocytów osób z różną historią kontaktu z wirusem odry (szczepionych i po naturalnym zakażeniu) na ponowną, wirusowo-swoistą stymulację *in vitro*. Jasno postawione cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Pragnę nadmienić, iż przedstawione w recenzji nieliczne uwagi nie podważają w żaden sposób merytorycznej wartości pracy, tym bardziej, iż większość wyników w niej zawartych została już opublikowana (*Informacje dodatkowe*).

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona przez Panią mgr Agnieszkę Częścik rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14.03.2003 roku (DZ.U. Nr 13.65.595 z dnia 16.04.2003) i wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zakład Wirusologii i Immunologii UMCS

prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska