

Agnieszka Częścik

Wpływ wirusowo-swoistej stymulacji limfocytów izolowanych od osób szczepionych przeciwko odrze lub po przebytych zakażeniu na odpowiedź immunologiczną *in vitro*

Streszczenie

Praca na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej
wykonana w Zakładzie Wirusologii
Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny

Promotor:

Dr hab. n. med. Joanna Siennicka, prof. NIZP-PZH

Warszawa 2015

Odra jest wysoce zakaźną chorobą wieku dziecięcego. W latach poprzedzających wprowadzenie rutynowych szczepień odnotowywano 2,6 miliona zgonów rocznie z powodu tej choroby. Obecnie, pomimo istnienia skutecznej szczepionki, odra nadal jest chorobą która zbiera śmiertelne żniwo, szczególnie w krajach rozwijających się. Obserwowane obecnie zachorowania w Polsce dotyczą przede wszystkim osób nieszczepionych i problem ten dotyczy głównie Romów. Zaznaczyć jednak należy, że zachorowania zdarzają się również wśród osób szczepionych, u których z nieznanymi jak dotąd przyczynami nie rozwinęła się odpowiedź poszczepienna. Inspiracją do podjęcia badań była chęć odpowiedzi na pytanie czy u osób, u których w wyniku szczepienia nie doszło do produkcji przeciwciał wytworzona została pamięć immunologiczna i czy jest ona równie silna w stosunku do szczepów obecnie izolowanych w Polsce jak i do tych, wchodzących w skład szczepionki. W pracy podjęto też badania dotyczące związku odpowiedzi immunologicznej z receptorami *Toll-like*.

W badaniu uczestniczyły osoby szczepione przeciwko odrze, z udokumentowaną historią szczepień, o znanym statusie serologicznym (seronegatywne i seropoztywne), oraz osoby nieszczepione, ale seropoztywne w wyniku naturalnego zakażenia (urodzone przed wprowadzeniem w Polsce szczepień).

Status serologiczny badanych osób został określony przy użyciu testu Enzygnost® Anti-Measles Virus/IgG (Siemens, Niemcy). Stwierdzono, że poziomy przeciwciał anty-MeV IgG u osób, które przechorowały odrę były istotnie wyższe niż te, uzyskane w wyniku szczepienia. Ponadto, poziom przeciwciał obserwowany u szczepionych po ponad 20 latach od immunizacji był niezależny od liczby dawek szczepionki, którą osoby te otrzymały (jedna lub dwie dawki). Dodatkowo w prezentowanej pracy, dokonano porównania poziomu przeciwciał dla wirusa odry oznaczanego testem Enzygnost® Anti-Measles Virus/IgG (Siemens, Niemcy) z poziomem uzyskanym w teście neutralizacji. Wyniki opisanych w pracy doświadczeń wskazują, że poziom 200 IU/ml anty-MeV NT Abs oznaczony testem neutralizacji PRNT odpowiada poziomowi 636 mIU/ml przeciwciał anty-MeV IgG uzyskanemu metodą EIA.

Charakterystyka parametrów odpowiedzi immunologicznej obejmująca oznaczenie liczby leukocytów krwi obwodowej, profilu limfocytów krążących i poziomu cytokin profilu Th1/Th2, wykazała, że osoby biorące udział w badaniu nie wykazywały niedoborów odporności. Następnie przeprowadzona została analiza wpływu szczepowo-zależnej stymulacji wirusem odry na odpowiedź ze strony limfocytów T CD4. Do stymulacji,

posłużyły dwa dzikie szczepy wirusa odry, wyizolowane od chorych na odrę (szczep W1 i W2) i szczep szczepionkowy Edmonston (E). Określenie częstości występowania aktywowanych limfocytów T CD4, przeprowadzano przy użyciu BD FastImmune CD4 Intracellular Cytokine Detection Kit Anti-Hu-IFN- γ /CD69/CD4/CD3-4color. Poziom aktywacji wyrażano jako odsetek limfocytów T wykazujących pod wpływem stymulacji ekspresję cząsteczki CD69 i produkcję IFN. Otrzymane wyniki wykazały, że u osób z różną historią pierwszego kontaktu z wirusem odry, wiele lat po zakażeniu lub szczepieniu, można wykryć wirusowo-swoiste limfocyty pamięci. Poza tym limfocyty T CD4 pewnego odsetka badanych osób w ogóle nie odpowiedziały na stymulacje żadnym z użytych szczepów wirusa odry (*non-responders*). Zaobserwowano, że liczba *non-responders* była najniższa wśród seropozytywnych osób szczepionych. Dodatkowo wykazano, że poziom przeciwciał przeciwko odrze nie korelował z obecnością limfocytów pamięci, co mogłoby sugerować, że odpowiedź humoralna i komórkowa są od siebie niezależne.

Poza mechanizmami odpowiedzi humoralnej i komórkowej mającymi wpływ na kształtowanie długotrwałej odpowiedzi na zakażenie wirusem odry, w pracy opisany został również wpływ aktywacji receptorów *Toll-like* na kształtowanie odpowiedzi immunologicznej u osób szczepionych przeciwko odrze, ale wykazującymi różny poziom przeciwciał (osoby seropozytywne i seronegatywne). Na podstawie doświadczeń innych badaczy, rozpatrywano aktywacje receptorów TLR2 i TLR4 pod wpływem stymulacji szczepem szczepionkowym wirusa odry Edmonston (E) i szczepami dzikimi (W1 i W2) komórek PBMC wyizolowanych od badanych osób. Poziom ekspresji receptorów *Toll-like* na poziomie mRNA oznaczano metodą *real-time one-step* RT-PCR z jednoczesną detekcją poszukiwanego genu (TLR2 lub TLR4) oraz genu referencyjnego (GAPDH). Wirusowo-swoisty wpływ działania dzikich szczepów wirusa odry na komórki PBMC pochodzące od szczepionych przeciwko odrze osób seronegatywnych przejawiał się w wyższym poziomie ekspresji genów TLR2 i TLR4 w porównaniu do ekspresji tych genów w PBMC osób seropozytywnych. Natomiast wpływ działania szczepu szczepionkowego wirusa odry miał charakter odwrotny, niż ten wywierany przez dzikie szczepy wirusa.

Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

1. Analiza odpowiedzi immunologicznej w grupach osób z różną historią pierwszego kontaktu z wirusem odry (osoby seropozytywne w wyniku naturalnego zakażenia oraz seropozytywne osoby szczepione) potwierdza fakt, iż atenuowana szczepionka przeciwko odrze indukuje odpowiedź jakościowo podobną do tej uzyskiwanej w wyniku naturalnego zakażenia, jednak poziomy wytworzonych przeciwciał są niższe.
2. Po upływie 20 lat od immunizacji, u badanych osób obserwowano niezależność poziomu przeciwciał przeciw odrowym od liczby dawek szczepionki, którą oni otrzymali.
3. Brak korelacji pomiędzy obecnością limfocytów pamięci zdolnych do aktywacji w wyniku wirusowo-swoistej stymulacji a poziomem przeciwciał przeciwko odrze sugeruje, że w ocenie ochrony przed zakażeniem wirusem odry powinien być rozpatrywany poziom zarówno odpowiedzi humoralnej, jak i komórkowej, a brak przeciwciał na poziomie uznawanym za ochronny nie jest równoznaczny z brakiem odporności na zakażenie wirusem odry.
4. Rodzaj użytego do aktywacji szczepu wirusa odry (szczepy dzikie i szczep szczepionkowy) ma wpływ na badaną w warunkach *in vitro* wirusowo-swoistą odpowiedź immunologiczną, wyrażaną poziomem ekspresji genów TLR2 i TLR4, co wskazuje na udział receptorów *Toll-like* w kształtowaniu odporności immunologicznej.

The first part of the paper discusses the importance of ethical leadership in the current business environment. It highlights the challenges faced by organizations and the need for leaders to set a positive example. The second part explores the theoretical framework of ethical leadership, drawing on concepts from moral identity theory and social exchange theory. The third part presents empirical evidence from a study of 200 employees, showing that ethical leadership is positively related to employee trust and organizational commitment. The final part offers practical implications for organizations and future research directions.

Organizational leaders play a crucial role in shaping the ethical climate of their organizations. In an era characterized by global financial crises and high-profile corporate scandals, the demand for ethical leadership has become more pronounced than ever. This paper examines the impact of ethical leadership on employee trust and organizational commitment. We define ethical leadership as a leader's demonstration of high ethical standards and integrity in their interactions with employees. Our research suggests that ethical leaders foster a climate of trust and transparency, which in turn leads to higher levels of employee commitment and performance. The findings have significant implications for organizations seeking to build a strong, ethical culture. Future research should continue to explore the mechanisms through which ethical leadership influences organizational outcomes.