

Dr hab. Edyta Paradowska, prof. nadzw. IBM PAN
 Pracownia Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej

Łódź, 1.02.2018

RECENZJA

Pracy doktorskiej Pana mgr. Tomasza Tomczyka

pt. „Immunologiczne następstwa zakażenia *in vitro* leukocytów krwi obwodowej człowieka wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej”

Potencjalne zastosowanie wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) jako wektora szczepionek przeciwwirusowych i terapeutycznych stanowi niezwykle istotny i aktualny temat badawczy. W ten nurt badań wpisuje się przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Tomasza Tomczyka pt. „Immunologiczne następstwa zakażenia *in vitro* leukocytów krwi obwodowej człowieka wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej”, która została wykonana w Laboratorium Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem dr. hab. Egberta Piaseckiego i dr Beaty Orzechowskiej jako promotora pomocniczego. Głównym celem rozprawy była identyfikacja leukocytów wrażliwych na zakażenie VSV w warunkach *in vitro* oraz określenie konsekwencji immunologicznych tego procesu, w tym m. in. ekspresji markerów powierzchniowych, stopnia apoptozy i profilu uwalnianych cytokin.

VSV należący do rodziny *Rhabdoviridae* jest wirusem osłonkowym, którego genom stanowi jednoniciowy RNA o ujemnej polarności. VSV jest patogenem zwierząt kopytnych, rzadko wywołującym zakażenia u ludzi w warunkach naturalnych. Zakażenie zwierząt prowadzi do występowania pęcherzyków w błonie śluzowej jamy ustnej i na skórze, natomiast u osób dorosłych może wywoływać objawy grypopodobne. Niski poziom seroprewalencji VSV w populacji ludzkiej, budowa genomu oraz zdolność do wywoływania silnej odpowiedzi immunologicznej powodują, że wirus ten jest dobrym kandydatem na wektora szczepionkowego. Doświadczalne szczepionki wektorowe wykorzystujące rVSV opracowano przeciwko różnym wirusom chorobotwórczym np. Ebola. Działanie onkolityczne VSV próbuje się także wykorzystać w wiroterapii nowotworów. Terapia wykorzystująca wirusy onkolityczne stanowi nowatorskie podejście do leczenia nowotworów wirusem, który zakaża a następnie eliminuje komórki nowotworowe. Przykładem wykorzystania VSV jako wirusa onkolitycznego nowej generacji są badania nad opracowaniem i zastosowaniem klinicznym produktu VSV-GP, w którym glikoproteinę osłonki VSV zastąpiono glikoproteiną wirusa limfocytarnego zapalenia opon i spłotów naczyńkowych (LCMV) w celu ograniczenia rozpoznania antygenu wirusowego przez układ odpornościowy gospodarza. Potencjał terapeutyczny VSV jest jednak ograniczony przez możliwość pojawienia się niepożądanych efektów ubocznych związanych głównie z neurotropizmem i neuropatogennością szczepów dzikich wirusa oraz silną immunogenność przejawiającą się m.in. produkcją przeciwciał przeciwko powierzchniowej glikoproteinie G już po podaniu pojedynczej dawki. W przypadku wykorzystania wirusa jako czynnika onkolitycznego istnieje także możliwość infekcji komórek prawidłowych i indukcji stanu zapalenia.

Wyniki badań prowadzonych w Laboratorium Wirusologii IIITD PAN wykazały, że VSV może namnażać się produktywnie w leukocytach i istnieje zależność między mianem wirusa zewnątrzkomórkowego a stężeniem uwalnianych cytokin. Wirus ten został wykorzystany w teście opracowanym przez zespół Pani prof. dr hab. Zofii Bach-Olszewskiej służącym do określania poziomu nieswoistej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dotychczas brak jest danych potwierdzających hemotropizm VSV w warunkach zakażeń naturalnych u ludzi. W kontekście możliwych zastosowań medycznych wirusa, badania nad wrażliwością komórek krwi na zakażenie VSV i jego immunologicznymi następstwami przeprowadzone przez Doktoranta są niezwykle istotne i potrzebne.

Rozprawa doktorska została przedstawiona do recenzji w postaci polskojęzycznego manuskryptu zawierającego 137 stron, w tym 4 tabele i 18 rycin. Układ tekstu rozprawy jest typowy dla doświadczalnych rozpraw doktorskich i składa się z następujących części: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Podsumowanie Wyników, Dyskusja i Wnioski. Całość poprzedzona jest listą osiągnięć Doktoranta przedstawiających uzyskane wyniki badań, Spisem Treści i Spisem Skróków, a zakończona Spisem Tabel i Rycin oraz Piśmiennictwem. Zarówno układ pracy, jak również poszczególnych rozdziałów jest dobrze przygotowany i ułatwia czytelnikowi lekturę dysertacji.

Streszczenie jest napisane prawidłowo i obejmuje wprowadzenie, cel pracy, opis badań i wyników oraz podsumowanie. Część doświadczalna pracy została poprzedzona dość obszernym **Wstępem** liczącym 30 stron. Wstęp rozpoczyna się od omówienia istotnych i aktualnych danych dotyczących VSV (w tym jego klasyfikacji, budowy, cyklu rozwojowego i patogenyzy), jak również stanu wiedzy z zakresu wykorzystania wirusa jako wektora szczepionkowego i terapeutycznego. W dalszej części wstępu autor zapoznaje czytelników z receptorami rozpoznającymi struktury wirusowe i mechanizmami wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, które prowadzą do aktywacji czynników transkrypcyjnych, a następnie produkcji cytokin prozapalnych oraz interferonu (IFN). Autor szczegółowo omówił odpowiedź interferonową oraz rolę monocytów i komórek dendrytycznych w warunkach zakażenia wirusowego. Dobór zagadnień omawianych we wstępie pracy jest przemyślany, tworzy logiczną całość i jest ściśle związany z wynikami prezentowanymi w dalszych rozdziałach pracy. Treść rozdziału i sposób omówienia poszczególnych zagadnień potwierdza szeroką wiedzę Doktoranta w tematyce badań.

Do tej części rozprawy mam kilka uwag. Podrozdział dotyczący receptorów Toll-podobnych mógłby być ograniczony wyłącznie do receptorów uczestniczących w rozpoznawaniu rabdowirusów i opisu odpowiednich szlaków przekazywania sygnału. W podrozdziale pt. *Receptory plazmatyczne rozpoznające VSV* nie znalazłam informacji, które receptory RIG-I-podobne uczestniczą w rozpoznawaniu RNA VSV. W oparciu o aktualny stan wiedzy, ważne wydaje się wyjaśnienie, które helikazy uczestniczą w rozpoznaniu VSV, wirusów RNA pochodzących z różnych rodzin i jaką rolę mogą odgrywać te receptory w identyfikacji wirusów DNA. Brak mi w tym rozdziale informacji o potencjalnej roli LGP2 w zakażeniu VSV, trzeciego z dotychczas poznanych receptorów RIG-I-podobnych.

Cele pracy są uzasadnione właściwie i przekonująco. Doktorant wskazuje liczne cele, które odzwierciedlają szczegółowy plan badawczy. Jestem przekonana, że ta część pracy zyskałaby w odbiorze przez czytelnika, gdyby Autor wyodrębnił cel główny lub cele kluczowe pracy. Cel główny, dotyczący identyfikacji subpopulacji leukocytów ludzkich wrażliwych na zakażenie VSV i następstw zakażenia, nie został w mojej ocenie przedstawiony w sposób wystarczająco jasny. Cenne wydaje się także podanie informacji o potencjalnej wartości poznawczej i aplikacyjnej przeprowadzonych badań.

Rozdział **Materiały i Metody** zawiera szczegółowe opisy stosowanych odczynników, materiałów i metod. Wszystkie wykorzystane procedury są opisane szczegółowo w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na uwagę zasługuje zróżnicowanie wykorzystanych metod m.in. ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, cytometrii przepływowej i luminometrii, co sugeruje doświadczenie Doktoranta w pracy laboratoryjnej.

Materiał do badań stanowiły próbki krwi obwodowej otrzymane od osób zdrowych, z których izolowano leukocyty. Zawiesinę leukocytów wzbogaconych monocytami zakażano doświadczalnie VSV i określano relatywną ekspresję genów kodujących receptory RIG-I-podobne i genów indukowanych IFN z normalizacją w odniesieniu do poziomu ekspresji genu referencyjnego $\beta 2M$. Określono poziom apoptozy w leukocytach i w komórkach CD4+ oraz aktywność kaspaz 3 i 7. W supernatantach z nad leukocytów kontrolnych lub zakażonych VSV określono stężenie wybranych cytokin (TNF α , IFN γ i IL10) i profil 25 cytokin. Podając informacje o użytym szczepie laboratoryjnym Indiana VSV można było wprowadzić nazwę vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV), który jest używany w piśmiennictwie i ogranicza wątpliwości co do zastosowania innych niż Indiana szczepów VSV np. szczepów dzikich wirusa. Autor powinien umieścić w pracy nazwy zestawów ELISA stosowanych do oznaczania stężenia cytokin.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktoranta potwierdziły możliwość replikacji VSV w ludzkich leukocytach i zróżnicowaną indywidualnie wrażliwość dawców na zakażenie wirusem. Wykazały ponadto, że w badanej populacji leukocytów tylko komórki HLA-DR+ i w mniejszym stopniu monocyty są wrażliwe na zakażenie VSV w warunkach *in vitro*. Należy zaznaczyć, że obecność białka G wirusa wykryto zaledwie w przypadku ok. 1% leukocytów, podczas gdy wskaźnik ten wynosił 54% dla komórek linii A549 zakażanych przy niższym MOI. Autor słusznie podzielił dawców na dwie grupy, osób słabo i silnie podatnych na zakażenie wirusem, i zaobserwował różnice w replikacji VSV i stężeniach uwalnianego TNF α . Leukocyty dawców charakteryzujących się większą wrażliwością na zakażenie VSV uwalniały wyższe stężenia TNF α w porównaniu do poziomu cytokiny uwalnianej przez komórki osób mniej wrażliwych. Otrzymane wyniki nie potwierdziły znanej aktywności przeciwwirusowej tej cytokiny. Zakażenie VSV zwiększało poziom relatywnej ekspresji genów dla badanych receptorów RIG-I-podobnych, RIG-I i MDA5, oraz genów indukowanych IFN, w tym głównie *MxM* kodującego białko dynamino-podobne *MxA*. Zaobserwowano ponad 30-krotny wzrost ekspresji *MxA* na poziomie mRNA a przypuszcza się, że białko to hamuje transport wirusów do jądra komórkowego. Aktywna replikacja wirusa powodowała różnicowanie się monocytów do niedojrzałych fenotypowo komórek dendrytycznych i znaczne obniżenie liczby komórek CD14+. Wykazano, że obniżenie liczby komórek CD14+ mogło być wynikiem apoptozy wywołanej zakażeniem VSV. Doktorant zaobserwował także zróżnicowanie indywidualne w produkcji cytokin przez leukocyty kontrolne i zakażone VSV. Leukocyty zakażone VSV uwalniały niższe stężenia RANTES, ale charakteryzowały się zwiększonym wytwarzaniem TNF α , IFN α , eotaksyny, IP-10 i IL-2R. Zaobserwowano ponadto wyższe stężenia eotaksyny, IFN γ , IL-1 β , -2 i -15 przez komórki osób słabiej podatnych na zakażenie VSV.

Uważam, że poczynione obserwacje są bardzo interesujące i powinny zostać w przyszłości potwierdzone na materiale pozyskanym od większej liczby dawców. Część badań została przeprowadzona w stosunkowo mało licznej grupie dawców krwi, którą trudno uznać za reprezentatywną np. ocena wrażliwości komórek HLA-DR+ na zakażenie VSV i analiza liczby komórek CD14+ zostały wykonane na materiale pozyskanym od czterech dawców. Interesującym wydaje się zaplanowanie badań umożliwiających porównanie wyników immunofenotypowania leukocytów w grupach dawców różniących się wrażliwością na zakażenie VSV. Bardzo istotne jest także potwierdzenie zwiększonej ekspresji receptorów rozpoznających RNA wirusowy i czynników indukowanych przez szlak sygnałowy IFN nie tylko na poziomie mRNA, ale także na poziomie białek. Wyniki tych badań mogłyby uzupełnić i w sposób jednoznaczny potwierdzić obserwacje poczynione na poziomie transkrypcji.

Dyskusja pracy została napisana dojrzałe a Doktorant w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. Niedosyt pozostawia opis możliwości wykorzystania praktycznego otrzymanych wyników.

Autor sformułował prawidłowo trzy główne **Wnioski** wskazując na zróżnicowaną wrażliwość ludzkich monocytów i komórek dendrytycznych na zakażenie doświadczalne VSV, która znalazła odzwierciedlenie w

zróżnicowanym profilu produkcji cytokin. Zakażenie VSV wpływało na różnicowanie się monocytów do niedojrzałych komórek dendrytycznych oraz powodowało apoptozę komórek CD14+.

Cytowane **Piśmiennictwo** obejmuje 280 pozycji. Są to głównie anglojęzyczne prace oryginalne, w tym prace polskich autorów. Bibliografia została dobrana i użyta w sposób właściwy.

Rozprawa została napisana starannie i poprawnie pod względem językowym i edytorskim. Zawiera niewiele błędów literowych i stylistycznych, co jest trudne do uniknięcia w tak obszernej monografii. Wszystkie przedstawione w pracy rysunki i tabele są czytelne, dobrze opisane i przygotowane z uwzględnieniem starań o stronę graficzną. Niemniej Autorowi nie udało się uniknąć drobnych błędów, niezręczności czy nieścisłości. Do obowiązków recenzenta należy ich odnotowanie:

- RNA to kwas nukleinowy, więc poprawne jest użycie sformułowania „oczyszczony RNA” w miejsce użytego „oczyszczone RNA”,
- nie wszystkie skróty używane w pracy zostały rozwinięte w zamieszczonym spisie (np. NOD), bądź też występują niekonsekwentnie w liczbie pojedynczej lub mnogiej (np. PBLs, PBMC),
- ze względu na posługiwanie się w piśmiennictwie aliasami nazw genów, sugeruję uzupełnienie najczęściej stosowanego nazewnictwa dla badanych genów np. *DDX58 (RIG-I)*, *IFIH1 (MDA5)*,
- często stosowane sformułowanie „administracja VSV” powinno być zastąpione innym określeniem np. „podanie”, natomiast „platforma” (w odniesieniu do wirusa) – wyrażeniem wektor, „ko-kultura” – wyrażeniem „hodowla mieszana”, a „plazma” – „osocze”,
- często stosowane zapożyczenia z języka angielskiego np. „była estymowana”, „receptory są ekspresjonowane” powinny być zastąpione odpowiednimi określeniami przyjętymi w języku polskim,
- podrozdział 5.1.3 „Wirusy” powinien zostać zatytułowany „Wirus”, gdyż podano w nim informacje o jednym wirusie. Rozdział „Cel Pracy” powinien zostać zatytułowany „Cele Pracy” skoro Autor wskazuje siedem celów badawczych.

Chciałabym podkreślić, że dostrzeżone przez mnie błędy i krytyka nie umniejszają wartości naukowej rozprawy i nie rzutują na bardzo pozytywną ocenę całości pracy.

Za ważny uważam fakt opublikowania części uzyskanych wyników w postaci artykułu naukowego w czasopiśmie *Journal of Innate Immunity* (Impact Factor - 3,938), w którym Doktorant jest pierwszym autorem.

Wniosek końcowy

W ocenie formalnej rozprawy stwierdzam, że praca ma prawidłową strukturę, napisana jest poprawnym językiem i jest starannie dopracowana. Błędy językowe, literowe i redakcyjne nie są liczne. Chciałabym zwrócić uwagę na bardzo czytelną formę prezentacji wyników, co sprawia, że są one łatwe w odbiorze dla czytelnika.

Podsumowując, badania opisane przez Doktoranta dotyczą interesującego tematu, z dużym potencjałem poznawczym i aplikacyjnym. Pan mgr Tomasz Tomczyk wykazał się szeroką wiedzą w podjętej tematyce badań. Badania wykonane z wykorzystaniem dobrze dobranych i zróżnicowanych metod pozwoliły na osiągnięcie zamierzonych celów. Jestem przekonana, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są oryginalne, wartościowe i mają dużą wartość naukową.

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą mgr. T. Tomczyka uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wszystkie wymogi rozprawy doktorskiej określone w art.13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami.

Z pełnym przekonaniem przedkładam więc Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk mój wniosek o dopuszczenie mgr Tomasza Tomczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na zakres objętych badań, uzyskane wartościowe wyniki poznawcze i jakość naukową ocenianej pracy zwracam się do Szanownej Rady o nagrodzenie pracy doktorskiej Pana Tomasza Tomczyka przewidziana w regulaminie nagrodą.



dr hab. n. med. Edyta Paradowska
prof. IBM PAN