



Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Sławomir A. Pancewicz

tel.: 85 831 65 14, 85 831 65 19,

e-mail: neuroin@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. med. Anna Moniuszko-Malinowska

Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Recenzja Rozprawy Doktorskiej Pani mgr Sylwii Osuch

pt. „Analiza zależności pomiędzy wyczerpaniem komórek T, zmiennością genetyczną epitopów wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) rozpoznawanych przez komórki T, a leczeniem przeciwwirusowym względem HCV”

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) dotyczy ok. 170 mln osób na świecie i stanowi poważny problem epidemiologiczny i kliniczny. Wirusowe zapalenie wątroby typu C może prowadzić do poważnych następstw: niewydolności wątroby oraz raka wątrobowo-komórkowego o wysokiej śmiertelności. Skryty przebieg zakażenia, ograniczony dostęp do diagnostyki i nowoczesnego leczenia, brak szczepionki są powodem ciągłego rozprzestrzeniania się wirusa na świecie. Koinfekcje, czyli jednoczesne zakażenie ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV-1) i HCV pogarszają przeżywalność pacjentów oraz skuteczność leczenia przeciwwirusowego.

W przewlekłym WZW typu C wykazano występowanie słabej odpowiedzi komórek T względem wirusa, polegającej na ich funkcjonalnym „wyczerpaniu”, pogorszeniu wydzielania czynników zapalnych (IFN- γ , TNF- α i IL-2), zdolności niszczenia zakażonych komórek oraz możliwości namnażania limfocytów T. Zaburzenia te postępują w miarę trwania zakażenia i charakteryzują się nadmiarem specyficznych receptorów PD-1 i Tim-3 na powierzchni komórek T. Obserwowano także zwiększone wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, np. IL-10. Związek pomiędzy różnorodnością epitopów HCV oraz jego wpływ na układ odpornościowy są słabo poznane. Uważam, że temat podjęty przez Doktorantkę jest bardzo

ważny, przede wszystkim z klinicznego punktu widzenia. Należy podkreślić nowatorski charakter pracy.

Przedstawiona rozprawa na stopień doktora ma układ typowy dla opracowań w postaci cyklu publikacji. W skład pracy przygotowanej przez Doktorantkę wchodzi następujące rozdziały: Wykaz skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Założenia i cele pracy, Podsumowanie i Wnioski, Kopie opublikowanych prac, Opinię Komisji Bioetycznej, Oświadczenie współautorów publikacji, Bibliografia, Dorobek naukowy. Podział na rozdziały jest przeprowadzony w sposób przejrzysty, umożliwiając zrozumienie podjęcia badań będących przedmiotem prezentowanej rozprawy.

Wstęp napisany jest bardzo profesjonalnie. Doktorantka wyczerpująco przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący WZW typu C i wciąż niewyjaśnionych problemów patogenetycznych zwracając uwagę na tzw. „wyczerpanie” odpowiedzi komórek T, które opisane zostało również w innych przewlekłych procesach zapalnych, np. w przebiegu zakażenia wirusem WZW typu B i wirusem HIV. Wstęp stanowi jasne wprowadzenie do tematyki badań i uzasadnia cele pracy. Doktorantka korzysta z najbardziej aktualnej wiedzy związanej z terapią z zastosowaniem leków DAA (leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (direct acting antivirals – DAA) o wysokiej skuteczności przeciwwirusowej i podejmuje próbę odpowiedzi na pytanie czy eliminacja przewlekłego zakażenia HCV na drodze leczenia z udziałem DAA powoduje odnowienie odpowiedzi komórek T i obniżenie ekspresji receptorów hamujących oraz stężenia IL-10, co może mieć implikacje terapeutyczne i profilaktyczne.

Doktorantka postawiła dwa dobrze sprecyzowane cele:

1) określenie zależności pomiędzy zmiennością genetyczną epitopów HCV rozpoznawanych przez komórki T CD8⁺, a „wyczerpaniem” odpowiedzi immunologicznej tych komórek w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C,

2) określenie wpływu skutecznego leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C z udziałem DAA na stopień „wyczerpania” odpowiedzi komórek T krwi obwodowej.

Następnie Doktorantka opisała publikacje wchodzące w skład rozprawy o łącznym IF 18,215 i 380 pkt. MEiN. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem a jej wkład w powstanie prac określono na 76, 72 i 80%, co zostało potwierdzone oświadczeniami współautorów. Doktorantka podjęła się ambitnego tematu, którego realizację przeprowadziła z dużą starannością.

W pierwszej pracy pt. „CD8⁺ T-cell exhaustion phenotype in chronic hepatitis C virus infection is associated with epitope sequence variation”, opublikowanej w *Frontiers in Immunology* przeprowadzono analizę zmienności epitopów HCV w kontekście „wyczerpania” komórek T CD8⁺ u 97 pacjentów w przewlekłej fazie zakażenia genotypem 1b wirusa. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały zależność pomiędzy sekwencjami analizowanych epitopów a fenotypem „wyczerpania” komórek T CD8⁺. Zakażenie dominującym wariantem o sekwencji epitopu NS31406, nie reprezentującym prototypu charakterystycznego dla HCV 1b (KLSGLGLNAV), ani też wariantu reaktywnego krzyżowo (KLSSLGLNAV, KLSGLGINAV lub KLSALGLNAV) było związane z wyższym odsetkiem limfocytów T CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ swoistych dla HCV. Zmienność sekwencji epitopu NS31406 była związana ze zwiększonym odsetkiem obwodowych komórek T o fenotypie CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ i niższym odsetkiem komórek T CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁻. Zakażenie dominującym wariantem epitopu NS31073 innym niż prototyp dla HCV 1b (CVNGVCWTV) było związane z niższym odsetkiem obwodowych limfocytów T CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺. Rodzaj obserwowanej zależności wydaje się więc swoisty dla kontekstu danego epitopu.

Wyniki te wskazują, że istnieje zależność pomiędzy odsetkiem komórek T z ekspresją receptorów PD-1/Tim-3 a sekwencją epitopów HCV rozpoznawanych przez komórki T oraz poziomem ich zmienności, co było widoczne nie tylko na poziomie całkowitych komórek T CD8⁺, ale również swoistych dla wirusa i sugerują, że analiza zjawiska „wyczerpania” komórek T wymaga oceny kontekstu sekwencji epitopów wirusa.

W drugiej pracy zatytułowanej „Decrease of T-cells exhaustion markers programmed cell death-1 and T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 and plasma IL-10 levels after successful treatment of chronic hepatitis C” opublikowanej w *Scientific Reports* metodą cytometrii przepływowej u 76 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, zakwalifikowanych do terapii z użyciem leków DAA wyodrębniono komórki T CD4⁺ oraz CD8⁺, a następnie przeprowadzono ocenę ekspresji receptorów PD-1 oraz Tim-3 na ich powierzchni.

Przed leczeniem, odsetki obwodowych komórek CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺, CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ oraz poziom IL-10 w osoczu były istotnie statystycznie wyższe, a odsetki komórek CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁻ oraz CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁻ niższe w grupie pacjentów, niż w grupie kontrolnej. Po leczeniu doszło do znamiennej zmniejszenia odsetków komórek T CD4⁺Tim-3⁺, CD8⁺Tim-3⁺, CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺, CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ oraz poziomu IL-10 w osoczu oraz równoczesnego wzrostu odsetków komórek fenotypu CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁻ oraz CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁻. Nie stwierdzono istotnych zmian w odsetku komórek T CD4⁺PD-1⁺, podczas

gdy odsetek komórek T CD8⁺PD-1⁺ znacząco wzrósł. Pacjentów z zaawansowanym zwłóknieniem wątroby charakteryzował wyższy poziom ekspresji PD-1 i niższy poziom ekspresji Tim-3 na komórkach T CD4⁺, a leczenie miało niewielki lub żaden wpływ na ekspresję markerów „wyczerpania” u tych pacjentów. Częstość występowania obwodowych komórek T CD8⁺ swoistych dla HCV uległa znaczącemu obniżeniu po leczeniu, ale poziom ekspresji PD-1 i Tim-3 na tych komórkach pozostał bez zmian.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wnioskuje, że skuteczne leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C jest związane ze zmniejszeniem poziomu IL-10 w osoczu oraz redukcją poziomu ekspresji markerów „wyczerpania” immunologicznego komórek T, ale efekt ten nie występuje u pacjentów z zaawansowanym zwłóknieniem wątroby. Sugeruje to, że długotrwałe zakażenie wirusem HCV powoduje nieodwracalne zmiany fenotypu tych komórek.

Trzecia publikacja pt. „Reversal of T Cell Exhaustion in Chronic HCV Infection”, opublikowana w *Viruses* mająca charakter pracy poglądowej, dotyczy syntezy aktualnego stanu wiedzy na temat odwracalności zjawiska „wyczerpania” u pacjentów z WZW typu C.

Doktorantka prawidłowo formułuje dwa wnioski, wynikające z wyników pracy i odpowiadające na postawione cele:

1. Zaobserwowano zależność pomiędzy odsetkiem komórek T z ekspresją receptorów PD-1/Tim-3 a sekwencją epitopów HCV rozpoznawanych przez komórki T oraz poziomem ich zmienności, co było widoczne nie tylko na poziomie całkowitych komórek T CD8⁺, ale również swoistych dla wirusa. Rodzaj obserwowanej zależności wydaje się swoisty dla kontekstu danego epitopu. W szczególności, zakażenie dominującym wariantem o sekwencji epitopu NS31406, nie reprezentującym prototypu charakterystycznego dla HCV1b (KLSGLGLNAV), ani też wariantu reaktywnego krzyżowo (KLSSLGLNAV, KLSGLGINAV lub KLSALGLNAV) była związana z wyższym odsetkiem limfocytów T CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ swoistych dla HCV. Analiza zjawiska „wyczerpania” komórek T powinna brać pod uwagę kontekst sekwencji epitopów wirusa.

2. Skuteczne leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C z zastosowaniem leków o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym jest związane ze zmniejszeniem poziomu IL-10 w osoczu oraz redukcją poziomu ekspresji markerów „wyczerpania” immunologicznego komórek T, ale efekt ten nie występuje u pacjentów z zaawansowanym zwłóknieniem wątroby. Sugeruje to, że przewlekłe WZW typu C powoduje nieodwracalne zmiany fenotypu tych komórek.

Brakuje rozdziału „Materiały i metody”, ale opisane w opublikowanych pracach metody są nowoczesne, dobrze dobrane i nie budzą wątpliwości. Bogactwo zastosowanych metod wpływa na jakość uzyskanych wyników.

Piśmiennictwo składa się z 60 starannie przedstawionych, aktualnych pozycji, w większości zagranicznych.

Dodatkowo na uwagę zasługuje pozostały dorobek Pani mgr Sylwii Osuch, na który składają się publikacje w renomowanych czasopismach o łącznym IF 19,676 pkt. oraz realizacja, jako wykonawca, Grantu Narodowego Centrum Nauki Sonata 10.

W pracy pojawiły się drobne błędy edytorskie i stylistyczne, które w żaden sposób nie wpływają na ocenę merytoryczną.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Sylwii Osuch pt. „Analiza zależności pomiędzy wyczerpaniem komórek T, zmiennością genetyczną epitopów wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) rozpoznawanych przez komórki T, a leczeniem przeciwwirusowym względem HCV” stanowi rzetelne badanie naukowe o dużej wartości poznawczej i ogromnym potencjale naukowym. Doktorantka udowodniła zdolność do prowadzenia badań naukowych, stosowania wielu technik badawczych oraz rozwiązywania trudnych problemów naukowych. Wyniki prowadzonych przez nią badań w dalszej perspektywie mogą przyczynić się do opracowania szczepionki, dzięki której możliwe będzie zmniejszenie obciążeń wynikających z zakażeń.

Nie mam wątpliwości, że Pani mgr Sylwia Osuch osiągnęła stopień dojrzałości naukowej upoważniający ją do ubiegania się o stopień doktora.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Sylwii Osuch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na nowatorski charakter pracy, publikację cyklu prac w renomowanych czasopismach naukowych o wysokim IF, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

2. wyrażam zgodę

Prof. Anna Monińska-Malinowska