

rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie
nauki medyczne

mgr Sylwii Osuch z Zakładu Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego

Tytuł rozprawy

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

Promotor rozprawy: dr hab. n.med. i n. o zdr. Kamila Caraballo Cortes

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) przez lata stanowiło wyzwanie dla świata medycznego z uwagi na skłonność do przechodzenia tego zakażenia w postać przewlekłą i niedostateczną skuteczność terapii przeciwwirusowych, czego efektem był duży odsetek powikłań w postaci marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego. Pomimo dostępnego obecnie skutecznego leczenia przeciwwirusowego w postaci bezpośrednio działających doustnych leków anty-HCV (DAA) schyłkowe formy zakażenia HCV nadal stanowią najczęstsze wskazania do przeszczepienia wątroby w krajach uprzemysłowionych. Nie traci zatem na znaczeniu badanie zjawisk prowadzących do przewlekania się zakażenia HCV i utrzymywania się pewnych niekorzystnych reakcji immunologicznych pomimo skutecznego leczenia przeciwwirusowego.

Wiadomo, że za efektywną kontrolę i eliminację zakażenia wirusowego odpowiadają swoiste efektorowe limfocyty T. W zakażeniu HCV tylko u części chorych dochodzi do właściwej odpowiedzi immunologicznej ze strony limfocytów T pomocniczych (CD4+) i cytotoksycznych (CD8+), prowadzącej do redukcji wirerii i stopniowej eliminacji zakażonych komórek gospodarza. W ponad 50% przypadków obserwuje się wyczerpywanie się funkcji efektorowych komórek T i przejście zakażenia w proces przewlekły. Uważa się, że za ten stan rzeczy odpowiada bardzo duża zmienność genetyczna HCV, przejawiająca się nie tylko w istnieniu wielu genotypów i subtypów HCV, ale w powstawaniu rozmaitych wariantów genetycznych HCV w organizmie jednego gospodarza (*quasispecies*). Ta zmienność genetyczna ma największą dynamikę w pierwszych miesiącach infekcji, a odpowiedzialne za to zjawisko są

bardzo duże tempo namnażania się wirusa i skłonność wirusowej polimerazy RNA do błędów replikacji i powstawania wielu mutacji wirusowych.

Celem pracy badawczej pani mgr Sylwii Osuch było ustalenie, czy jedną z przyczyn „wyczerpania” cytotoksycznych komórek T CD8+ jest zmienność epitopów HCV, rozpoznawanych przez te limfocyty, oraz czy zjawisko „wyczerpania” immunologicznego ustępuje po skutecznej terapii przeciwwirusowej.

Pani mgr Sylwia Osuch przedłożyła do oceny cykl trzech publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) 18,215, w których jest pierwszym autorem:

1. *CD8+ T-cell exhaustion phenotype in chronic hepatitis C virus infection is associated with epitope sequence variation*. *Frontiers in Immunology* 2022; 13: 1-15.
2. *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*. *Scientific Reports* 2020; 10: 1 – 17.
3. *Reversal of T cell exhaustion in chronic HCV infection*. *Viruses* 2020; 12: 1 – 20.

Dwie pierwsze publikacje mają charakter prac oryginalnych, a trzecia jest pracą poglądową. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wszystkie ukazały się w prestiżowych czasopismach naukowych o tematyce immunologicznej bądź wirusologicznej.

Celem pierwszej pracy było określenie zależności pomiędzy zmiennością epitopów HCV a wyczerpaniem komórek CD8+, które mają za zadanie rozpoznawanie i niszczenie komórek zakażonych różnymi wariantami genetycznymi HCV. Markerami wyczerpania immunologicznego, badanymi przez Doktorantkę, były poziom ekspresji receptora programowanej śmierci komórki PD-1, oraz innego receptora hamującego – transbłonowej immunoglobuliny i mucyny limfocytu T (Tim-3). W kontekście wyczerpania immunologicznego analizie poddano najbardziej immunogenne sekwencje genotypu 1b wirusa, rozpoznawane przez CD8+, zlokalizowane w regionie kodującym białko niestrukturalne NS3/4a. Doktorantka wykazała zależność pomiędzy sekwencjami analizowanych epitopów HCV a ekspresją receptorów PD-1/Tim-3, co oznacza, że fenotyp

wyczerpania limfocytów CD8+ należy postrzegać w zestawieniu ze zmiennością antygenową HCV. Może to tłumaczyć, dlaczego tylko 30-50% zakażonych genotypem 1b HCV ma szansę na samoeliminację zakażenia.

Celem badawczym drugiej publikacji było określenie wpływu skutecznego leczenia HCV przy pomocy DAA na stopień „wyczerpania” odpowiedzi limfocytów T krwi obwodowej. Poza ekspresją PD-1 oraz Tim-3 Doktorantka badała poziom prozapalnej IL-10 we krwi chorych przed i po skutecznym leczeniu DAA. Przy zastosowaniu specjalnego protokołu opracowanego przez prof. Roberta Thimme z uniwersytetu we Fryburgu Doktorantka analizowała „wyczerpanie” komórek CD4+ i CD8+ HCV-swoistych, a nie tylko całkowitych komórek T. Doktorantka wykazała, że po skutecznym leczeniu anty-HCV znamienne wzrastał odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ o fenotypie PD-1⁻ i Tim-3⁻ oraz spadał poziom IL-10, czyli cofało się „wyczerpanie” efektorowych komórek T. Dotyczyło to jednak pacjentów z włóknieniem wątroby w zakresie F0-F2, a u pacjentów z bardzo zaawansowanym włóknieniem leczenie miało nieistotny wpływ na markery wyczerpania immunologicznego.

O ile pierwsze doniesienie niesie ze sobą ważny walor poznawczy, poszerzający naszą wiedzę o immunopatologii zakażenia HCV, o tyle druga praca ma bardzo ważny aspekt praktyczny. Wynika z niej, że u chorych z zaawansowanym zakażeniem HCV, pomimo skutecznego leczenia DAA i eliminacji HCV RNA z krwi obwodowej nie możemy zaniechać dalszego nadzoru z uwagi na możliwość rozwoju marskości wątroby, a zwłaszcza raka wątrobowokomórkowego.

Na szczególne podkreślenie zasługuje duża grupa badana (97 osób) oraz bardzo rzetelny i nowoczesny warsztat badawczy. Doktoranta samodzielnie posługuje się takimi zaawansowanymi metodami biologii molekularnej jak NGS (sekwencjonowanie następnej generacji) czy wyrafinowanymi analizami cytometrycznymi w postaci wielopoziomowej cytometrii przepływowej, wymagającej wysokiego stopnia standaryzacji.

Jednocześnie należy zauważyć, że badania Doktorantki nad wyczerpaniem immunologicznym były ograniczone jedynie do populacji pacjentów zakażonych genotypem 1b HCV. Nie wiadomo, czy wnioski z analizowanych badań można rozciągnąć na inne genotypy, zwłaszcza, że warianty 1b i 3a wykazują pewne odmienności w przebiegu klinicznym i zróżnicowaną reakcję na leczenie przeciwwirusowe. Wymaga to komentarza.

Poza tym badanie ma charakter statyczny, czyli analizowany jest jeden punkt czasowy po zakończeniu leczenia przeciwwirusowego (6 miesięcy). Byłoby bardzo ciekawe, zwłaszcza w odniesieniu do pacjentów z zaawansowanym włókniem F3, zbadanie czy stopień „wyczerpania” komórek T jest zmienny w czasie, czy też jest to proces nieodwracalny.

Poza przedstawionym cyklem prac, będących podstawą rozprawy doktorskiej, pani mgr Sylwia Osuch legitymuje się współautorstwem kilku innych prac badawczych, publikowanych w czasopismach o dużym wskaźniku oddziaływania. Łączny IF publikacji mgr Sylwii Osuch wynosi 37,891. Doktorantka realizowała dwa granty badawcze: projekt „Młodych” WUM nr 13/M/MBM/N/21 oraz grant NCN Sonata 10 nr 2015/19/D/NZ6/01303, była laureatka dwóch stypendiów – doktorskiego i projakościowego.

Cykl prac, zatytułowany „Analiza zależności pomiędzy wyczerpaniem komórek T, zmiennością genetyczną epitopów wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) rozpoznawanych przez komórki T, a leczeniem przeciwwirusowym względem HCV”, spełnia wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi, gdyż stanowi samodzielne i rzetelnie przeprowadzone rozwiązanie jasno sformułowanych celów badawczych z przedstawieniem ważnych z poznawczego i praktycznego punktu widzenia wniosków. Spełnia więc warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668).

W oparciu o powyższe stawiam wniosek do wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Sylwii Osuch do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoki wskaźnik oddziaływania opublikowanych prac wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o wyróżnienie rozprawy mgr Sylwii Osuch *summa cum laude*.

Z poważaniem,

Marta Wawrzynowicz-Syczewska

Prof. dr hab. n. med.
Marta Wawrzynowicz-Syczewska
internista
specjalista chorób zakaźnych
transplantolog

Szczecin, 11.03.2023r.