



UCZELNIA
ŁAZARSKIEGO

Recenzja Rozprawy Doktorskiej Rada Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawski Uniwersytet Medyczny

Imię i nazwisko kandydata: **mgr Sylwia Osuch**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **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: **dr hab. n. med. i n. o zdr. Kamila Caraballo Cortés**

Recenzent: **dr hab. n. med. i n. o zdr. Katarzyna Donskow-Łysoniewska**

Zakład Immunoterapii Eksperymentalnej, Wydział Medyczny, Uczelnia Łazarskiego

Wartość naukowa rozprawy

Oryginalność badań

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne przygotowana przez Panią magister Sylwię Osuch dotyczy zjawiska „wyczerpania” limfocytów T w przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu C wywołanego zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV, hepatitis C virus). Wirusowe zapalenie wątroby jest poważnym problemem zdrowia publicznego na całym świecie. Obecnie szacuje się, że około 58 milionów ludzi cierpi na przewlekłe zapalenie wątroby typu C, a około 400 tysięcy osób umiera każdego roku z powodu jego powikłań, w wyniku marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego (HCC, hepatocellular carcinoma).

Pomimo stosowanych obecnie terapii bezpośrednio działającymi lekami przeciwwirusowymi (DAAs, direct acting antivirals), które pozwoliły na uzyskanie trwałej odpowiedzi przeciwwirusowej u pacjentów przy mniejszej liczbie efektów ubocznych i wskaźnikach wyleczenia zbliżających się do 100%, u pacjentów z zaawansowaną marskością wątroby dochodzi do rozwoju raka wątrobowokomórkowego. Dlatego nadal istnieje potrzeba opracowania nowych rozwiązań



terapeutycznych o wysokiej efektywności i wysokim profilu bezpieczeństwa dla pacjentów zakażonych HCV. Za niewydolną odpowiedź immunologiczną limfocytów T w zakażeniu odpowiada między innymi zjawisko „wyczerpania”, w wyniku którego dochodzi do utraty ich funkcji efektorowych, co skutkuje niewydolnością odpowiedzi immunologicznej w fazie przewlekłej. Zjawisko „wyczerpania” limfocytów w przebiegu przewlekłych infekcji wirusowych nie jest do końca zrozumiałe i jest obecnie intensywnie badane, co klasyfikuje oryginalność podjętych przez Doktorantkę badań bardzo wysoko.

Wartość naukowa artykułów

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Sylwii Osuch została przygotowana w Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. n. med. i n. o zdr. Kamili Caraballo Cortés. Badania realizowane były w ramach projektu „Analiza zależności między „wyczerpaniem” komórek T, zmiennością genów kodujących epitopy wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) rozpoznawane przez komórki T, a wpływem leczenia przeciwwirusowego u pacjentów z zakażeniem HCV oraz współzakażeniem HIV-1/HCV”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (Sonata 10, nr projektu 2015/19/D/NZ6/01303).

Rozprawa została zaprezentowana w formie spójnego tematycznie zbioru trzech publikacji naukowych, w tym dwóch prac oryginalnych i jednej pracy przeglądowej:

1. Osuch Sylwia, Laskus Tomasz Jacek, Perlejewski Karol, Berak Hanna, Bukowska-Ośko Iwona Anna, Pollak Agnieszka, Zielenkiewicz Magdalena, Radkowski Marek Mirosław, Caraballo Cortés Kamila. *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. Osuch Sylwia, Laskus Tomasz Jacek, Berak Hanna, Perlejewski Karol, Metzner Karin J., Paciorek Marcin, Radkowski Marek Mirosław, Caraballo Cortés Kamila. *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): 1- 17.
3. Osuch Sylwia, Metzner Karin, Caraballo Cortés Kamila. *Reversal of T Cell Exhaustion in Chronic HCV Infection*. *Viruses*. 2020; 12(8): 1-20.





Powyższe tytuły czasopism: *Frontiers in Immunology*, *Scientific Reports* i *Viruses* należą nie tylko do wysoko punktowanych ale również opiniotwórczych czasopism naukowych. Sumaryczny pięcioletni wskaźnik przebiccia zaprezentowanych publikacji (IF) wynosi 18,215. We wszystkich zaprezentowanych artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem i jak wskazują załączone oświadczenia współautorów, uczestniczyła we wszystkich etapach powstawania prac: od zgromadzenia, opracowania i analizy danych klinicznych, po opracowanie metodologii, prowadzenie prac badawczych i przygotowanie manuskryptu w przypadku prac oryginalnych oraz określenia koncepcji pracy i przygotowania manuskryptu z opracowaniem graficznym, w przypadku pracy przeglądowej. Świadczy to o wysokim poziomie samodzielności Doktorantki w pracy naukowej.

Warto dodać, że wyniki rozprawy doktorskiej były prezentowane na dwóch konferencjach międzynarodowych a Doktorantka jest także współautorem w 5 publikacjach naukowych zaprezentowanych w renomowanych czasopismach naukowych (*Vaccines*, *Scientific Reports*, *Journal of Viral Hepatitis*, *Scientific Reports*, *PLoS One*) o łącznym IF 19,676.

Wartość merytoryczna rozprawy

W swojej rozprawie doktorskiej Doktorantka postawiła sobie dwa zasadnicze cele.

Pierwszym celem było określenie zależności pomiędzy zmiennością genetyczną epitopów wirusa HCV rozpoznawanych przez limfocyty T CD8⁺, a ich „wyczerpaniem” w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C. W tej części pracy analizowano krew obwodową 97 pacjentów w przewlekłej fazie zakażenia genotypem 1b wirusa HCV. W pobranym materiale określono poziom markerów powierzchniowych PD-1 i Tim3 na limfocytach T CD8⁺, charakterystycznych dla komórek w zaawansowanym stadium „wyczerpania”. Badania prowadzono przy użyciu metody cytometrii przepływowej. W tym samym materiale metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS) analizowano sekwencje najbardziej immunogennych epitopów rozpoznawanych przez limfocyty T CD8⁺, zawarte w regionie kodującym białko niestrukturalne NS3/4a: NS31073 oraz NS31406, rozpoznawane w kontekście allelu HLA-A*02, jak i NS31436, rozpoznawany w kontekście HLA-A*01.

Wyniki analiz wykazały, zależność pomiędzy odsetkiem limfocytów T CD8⁺ wykazujących ekspresję receptorów PD-1/Tim-3 a sekwencją epitopów HCV przez nie rozpoznawanych. Wykazano, że wyższy odsetek „wyczerpanych” limfocytów T CD8⁺ występował u pacjentów z dominującym





wariantem o sekwencji epitopu NS31406, nie reprezentującym prototypu 19 charakterystycznego dla HCV 1b (KLSGLGLNAV), ani też wariantu reaktywnego krzyżowo (KLSSLGLNAV, KLSGLGINAV lub KLSALGLNAV).

Drugim celem przedstawionej rozprawy było określenie wpływu skutecznego leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C bezpośrednio działającymi lekami przeciwwirusowymi na stopień „wyczerpania” limfocytów T krwi obwodowej. Badania przeprowadzono na 76 pacjentach z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. Krew obwodową pacjentów pobierano przed rozpoczęciem terapii i 6 miesięcy po jej zakończeniu. Określono poziom markerów powierzchniowych PD-1 i Tim3 na limfocytach T $CD8^+$ i $CD4^+$. W związku z tym, że limfocyty $CD8^+$ HCV-swoiste są subpopulacją małoliczną we krwi obwodowej zastosowano metodę wzbogacenia w zawiesinie wykorzystując połączenie znakowania komórek z użyciem pentameru HLA-A*02 MHC sprzężonego z fluorochromem oraz separacji magnetycznej z użyciem mikrosfer magnetycznych. W osoczu określono poziom IL-10 testem ELISA. W ramach badań Doktorantka wykazała, że 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 „wyczerpania” limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$. Efekt taki nie występował w limfocytach T pacjentów z zaawansowanym zwłóknieniem wątroby.

Jakkolwiek wyniki pracy zostały zweryfikowane i pozytywnie ocenione przez ekspertów powołanych na recenzentów prezentowanych artykułów, jako Recenzentowi rozprawy nasuwa mi się kilka pytań i komentarzy.

W opisie realizacji pierwszego i drugiego celu badawczego zabrakło mi szerszego przedstawienia grupy badanej i zasad klasyfikacji pacjentów do badania. Tak istotne informacje powinny znaleźć się w opisie grupy badanej niezależnie od tego, że zostały zawarte w załączonych artykułach.

Jakimi parametrami doboru grupy badanej kierowała się Doktorantka i jakie kryteria wyłączenia wzięto pod uwagę?

Jakimi lekami leczeni byli pacjenci? Czy wszyscy pacjenci byli leczeni przez taki sam okres, jakie są parametry decydujące o zakończeniu terapii i czy czas trwania terapii może mieć wpływ na poziom „wyczerpania” limfocytów T badanych w 6 miesięcy od zakończenia terapii.

Istotną kwestią jest obecność receptora Tim3 na komórkach NK. Komórki NKT obecne we krwi obwodowej wykazują ekspresję cząsteczek powierzchniowych $CD4^+$ i $CD8^+$. Czy brak identyfikacji komórek NKT i negatywnego bramkowania w badanych próbach może wg Doktorantki jakkolwiek wpływać na uzyskane wyniki?



W opisie wyników Doktorantka zamiennie stosuje termin *ekspresja* i *procent komórek* w odniesieniu do komórek pozytywnych pod względem badanego markera, co bywa miejscami mylące. Jakkolwiek w pracach naukowych znajdują się tego typu uproszczenia należałoby w przyszłości używać precyzyjnej i jednolitej nomenklatury, nawet jeżeli wymaga to wielokrotnych powtórzeń.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska zawiera klasyczny układ pracy, na który składają się Spis treści, Wykaz skrótów, jednobrzmiące Streszczenia w języku polskim i angielskim, liczący 4 strony Wstęp, Założenia i cel pracy, Opis realizacji celu 1, Opis realizacji celu 2, Podsumowanie i wnioski, Kopie opublikowanych prac, Opinia Komisji Bioetycznej, Oświadczenia współautorów publikacji, Bibliografia, którą stanowi 60 pozycji oraz wskazanie Dorobku naukowego Doktorantki.

W streszczeniu wyodrębniono dwie części rozprawy odpowiadające dwóm postawionym celom badawczym z opisem realizacji tych celów. Krytyczna uwaga dotyczy rozdziału „Założenia i cel pracy”. W mojej ocenie paragraf ten powinien być zatytułowany „Cel pracy” ponieważ Doktorantka w tym miejscu wskazuje jednoznacznie dwa cele rozprawy, a sformułowanie „założenia” i „cele” nie są tożsame. Opis realizacji celu 1 oraz opis realizacji celu 2 nie są ujęte w spisie treści ale wydają się stanowić oddzielne rozdziały odpowiadające opisowi zastosowanej metodyki badawczej i otrzymanym wynikom.

Z punktu widzenia Recenzenta zabrakło mi szerszej interpretacji wyników obu prac oryginalnych, krytycznego odniesienia się do całości uzyskanych wyników a także wskazania kolejnych niezbędnych kierunków badawczych w obszarze opisywanych badań, jakie widzi Doktorantka.

Pod względem edycyjnym praca przygotowana jest schludnie a jakość umieszczonych rycin, tabel i schematów nie budzi zastrzeżeń. Drobne błędy edytorskie są nieliczne. Język zastosowany w rozprawie jest poprawny a treści są zrozumiałe pomimo złożoności opisywanych zjawisk. Świadczy to o znajomości tematu i dużej swobodzie posługiwania się językiem naukowym przez Doktorantkę. Z racji obowiązku Recenzenta winna jestem jednak zauważyć, iż w niektórych miejscach Doktorantka używa skrótów myślowych, jak np. „wyczerpanie” *odpowiedzi immunologicznej* czy „wyczerpanie” *odpowiedzi komórek T* (str. 8, 18). Zjawisko wyczerpania dotyczy komórek, w tym przypadku limfocytów T. Zasygnalizowane błędy mają jednak marginalne znaczenie dla ogólnego odbioru rozprawy.