

Łódź, 12 marca 2018 r.

dr hab. Marek Fol, prof. nadzw. UŁ
kierownik Zakładu Immunologii Komórkowej
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Karola Majewskiego
pt. „Poziom katelicydyny LL-37 u pacjentów z bakteryjną infekcją dolnych dróg
oddechowych oraz aktywną gruźlicą płuc”
sporządzona dla Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Karola Majewskiego dotyczy zagadnień związanych z epidemiologią i immunologią zakażeń prątkiem *Mycobacterium tuberculosis* - czynnikiem etiologicznym gruźlicy u ludzi. Choroba ta, pomimo stosowanych od dekad szczepień ochronnych w postaci szczepionki BCG oraz dostępności licznych chemioterapeutyków przeciwprątkowych, wciąż stanowi realne wyzwanie dla publicznej ochrony zdrowia, co znalazło potwierdzenie w globalnym raporcie gruźliczym Światowej Organizacji Zdrowia, stwierdzającym iż rządy nie radzą sobie z zakończeniem epidemii gruźlicy, a liczba chorych wzrosła z 9,6 mln w 2014 r. do 10,4 mln w 2015 r. przy liczbie zgonów sięgającej 1,4 mln osób na całym świecie. Ponadto w raporcie stwierdzono, że aby ograniczyć liczbę przypadków gruźlicy, potrzeba szacunkowo dodatkowo 1 miliarda dolarów amerykańskich rocznie, co pozwoliłoby przyspieszyć prace nad powstaniem nowych szczepionek, udoskonalić diagnostykę oraz zmodyfikować/opracować związki prątkobójcze. Gruźlica pozostaje zatem nadal chorobą XXI w. i w tym kontekście praca mgr. Karola Majewskiego doskonale wpisuje się w aktualną tematykę badań.

W Polsce 30 lat temu zapadalność na gruźlicę wynosiła około 150 przypadków na 100 tys. mieszkańców, w 2000 roku około 31, a obecnie poniżej 17 przypadków na 100 tys. osób i tym samym nasz kraj należy do państw Unii Europejskiej o niskiej

zapadalności, przy czym wciąż wyższej niż w pozostałych 22 krajach Unii o zapadalności poniżej 10 przypadków/100 tys., jednakże zdecydowani niższej niż w 5 krajach Unii o najwyższym odsetku zachorowań, np. Rumunii – 76,5 na 100 tys. Ustabilizowana sytuacja epidemiologiczna w kraju nie może jednak zwalniać z uważnej obserwacji bieżących wydarzeń, zwłaszcza w kontekście drastycznie nasilających się w ostatnich latach ruchów migracyjnych, szczególnie z terenów byłego Związku Radzieckiego, w tym Ukrainy, gdzie według oficjalnych danych, 35 tys. osób jest chorych na gruźlicę, z czego blisko połowa jest chora na gruźlicę wielolekooporną, a według danych nieoficjalnych chorych na gruźlicę jest około 600 tys. Liczba rejestrowanych przypadków gruźlicy nie oddaje całej złożoności sytuacji, bowiem infekcja prątkiem gruźlicy ma wyjątkowy charakter, przejawiający się zdolnością prątka do przeżycia w organizmie gospodarza przez bardzo długi czas (lata) w postaci zakażenia latentnego, które dzięki specyficznej „równowadze sił” między mechanizmami odpornościowymi organizmu człowieka a prątkiem nie manifestuje się żadnymi objawami klinicznymi choroby. Nie jest to jednak odporność bezwzględna i może zostać przełamana, tym samym ryzyko zachorowania utrzymuje się przez całe życie. Taki właśnie monitorujący charakter ma jedna z prac wchodzących w skład cyklu publikacji niniejszej dysertacji, a mianowicie: „Evaluation of detection and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in patients in the Łódzkie voivodship in 2009-2013” opublikowana w *Przeglądzie Epidemiologicznym* (2015, 69: 453-458). Bieżący, szczegółowy monitoring stanu epidemiologicznego w zakresie zapadalności na gruźlicę w regionie łódzkim to szczególnie istotna sprawa, bowiem województwo łódzkie plasuje się od lat w krajowej czołówce zapadalności na tę chorobę. Jakże czynniki mogłyby wpływać na taki stan rzeczy bądź o nim decydować w opinii Doktoranta?

W przebiegu infekcji prątkiem gruźlicy dochodzi do uruchomienia zarówno mechanizmów odpornościowych typu komórkowego jak i humoralnego, przy czym najczęściej uwagi poświęca się odpowiedzi komórkowej, co wynika ze specyfiki tego drobnoustroju, będącego wewnątrzkomórkowym patogenem. Ukryty wewnątrz komórek fagocytarnych i pośród tkanek martwiczych patogen jest praktycznie niedostępny dla produktów odpowiedzi humoralnej, np. przeciwciał. Nie oznacza to bynajmniej, że ten przejaw odpowiedzi odpornościowej należy bagatelizować, bowiem odpowiedź humoralna może dostarczyć potencjalnych markerów obecności zakażenia prątkiem. To drugi, poza epidemiologicznym, wiodący aspekt przedstawionej do recenzji pracy, który reprezentowany jest przez tytułową katelicydynę LL-37. Ten niewielki peptyd wytwarzany w organizmie człowieka, należący do grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych, stanowi element odpowiedzi humoralnej, jednakże dane na temat jego poziomu i znaczenia

w przebiegu chorób infekcyjnych są ograniczone i często rozbieżne. Tym samym należy podkreślić znaczenie tego właśnie aspektu ocenianej pracy doktorskiej i określić go jako wiodący, co słusznie znalazło swoje odzwierciedlenie w tytule rozprawy.

Będąca przedmiotem recenzji rozprawa doktorska stanowi cykl spójnych tematycznie pięciu oryginalnych publikacji naukowych opatrzonych 13-stronicowym opisem. Sumaryczna wartość współczynnika wpływu *impact factor* (IF) wspomnianych prac wynosi 4,652, co odpowiada 82 punktom MNiSW (nie wskazano, czy wartości te odnoszą się do roku publikacji artykułu, czasu, w którym rozprawa doktorska została przygotowana czy też reprezentują 5-letni współczynnik wpływu). Warto podkreślić, że: po pierwsze Pan Karol Majewski jest pierwszym autorem każdej z pięciu prac, a jego udział w ich powstaniu waha się od 50 do 65%, co wskazuje na wiodącą rolę Doktoranta w prezentowanych badaniach, a ponadto zostało potwierdzone stosownymi oświadczeniami; po drugie żadna z ujętych w cyklu prac nie ukazała się później niż 3 lata temu, co więcej, dwie z nich posiadają status prac przyjętych do druku (zamieszczono stosowne potwierdzenia z wydawnictw). Dla porządku należy odnotować, iż jedna publikacja jest spoza listy Journal Citation Reports (JCR) i znajduje się w części B wykazu czasopism naukowych MNiSW. Nie zmienia to oczywiście faktu, iż zbiór publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską w całości spełnia, a nawet przewyższa, minima zdefiniowane w warunkach ubiegania się o stopnie naukowe lub tytuł naukowy w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi, zgodnie z Uchwałą nr 30/2017 z dnia 26 stycznia 2017 r. Senatu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w sprawie warunków ubiegania się o nadanie stopni naukowych lub tytułu naukowego w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

Opis, będący integralną częścią rozprawy doktorskiej przygotowanej w oparciu o dorobek publikacyjny, składa się z kilku elementów, z których najistotniejsze to: „Wprowadzenie”, „Cel pracy”, „Metodyka badań”, „Omówienie wyników” i „Wnioski”. Łącznie stanowią one wartościowe uzupełnienie kluczowego elementu pracy, jakim jest zbiór 5 prac oryginalnych. Sprawnie napisane „Wprowadzenie” dobrze oddaje charakter cyklu publikacyjnego, zarysowuje wcześniej omówione dwa główne aspekty rozprawy, zachowując przy tym ich spójność. Najistotniejszym wspólnym ogniwem omawianych prac jawi się grupa badawcza obejmująca chorych ze zdiagnozowaną aktywną gruźlicą płuc, u których w surowicy oceniano poziom katelicydyny LL-37, a także innych czynników humoralnych, takich jak czynnik martwicy nowotworu (TNF) i witamina D. Jako punkty odniesienia słusznie wytypowano grupy chorych na zapalenie płuc wywołane przez bakterie Gram-dodatnie bądź Gram-ujemne oraz grupę osób zdrowych. Takie podejście znalazło swoje odzwierciedlenie w jasno sformułowanym celu pracy. Blisko dwustronicowy rozdział

„Metodyka badań” naświetla proces rekrutacji ochotników do badań i analizy ich stanu zdrowia, określa wachlarz testów z zakresu diagnostyki medycznej oraz pokrótce opisuje procedurę identyfikacji czynnika etiologicznego zapalenia płuc, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki w kierunku *M. tuberculosis*. Stanowi tym samym cenny element rozprawy, bowiem zawiera te informacje, które z różnych względów albo nie mogły zostać umieszczone w prezentowanych publikacjach naukowych, albo zawarte zostały jedynie w ograniczonym zakresie. Pewien niedosyt budzi tutaj jedynie fakt, iż Doktorant, wspominając o użytych nowoczesnych technikach służących diagnostyce prętka gruźlicy w materiale biologicznym, np. zautomatyzowanej hodowli na podłożu płynnym w aparacie BACTEC MGIT 960 w oparciu o zamknięte systemy fluorescencyjne, nie zdecydował się na jakiegokolwiek scharakteryzowanie tych metod i wyjaśnienie ich komplementarnego bądź innowacyjnego charakteru względem metod klasycznych. Rozdział „Omówienie wyników” odnosi się do najistotniejszych rezultatów badań zawartych w prezentowanym cyklu publikacji. Należy zwrócić uwagę, że wyniki te powstały w oparciu o bardzo dużą liczbę przebadanych próbek materiałów biologicznych pochodzących od grup badawczych o dużej liczebności i podlegały już krytycznej ocenie w ramach trybu recenzowania publikacji w czasopiśmie naukowym. W artykule opublikowanym w *Clinical and Investigative Medicine* (2017, 40: E34-E39) stwierdzono między innymi, że poziom katelicydiny LL-37 u chorych na gruźlicę płuc był statystycznie znamienne wyższy niż u osób z zapaleniem płuc, którego przyczyną była infekcja wywołana przez bakterie Gram-dodatnie bądź Gram-ujemne (odpowiednio: $13,94 \pm 5,13$ ng/ml vs. $7,87 \pm 4,58$ ng/ml i $10,27 \pm 3,60$ ng/ml) i aż niemal 8-krotnie wyższy w porównaniu z osobami zdrowymi ($1,75 \pm 0,71$ ng/ml). Podobny obraz wyłania się z pracy zaakceptowanej do druku w *Central European Journal of Immunology* (2018, 4): wyższy poziom tego peptydu odnotowano u osób z bakteryjnym zapaleniem płuc wywołanym przez różne Gram-dodatnie ziarenkowce, Gram-ujemną pałeczkę *H. influenzae*, bądź bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, w porównaniu do grupy zdrowych ochotników, odpowiednio: $5,25 \pm 19,25$ ng/ml, $3,79 \pm 8,89$ ng/ml, $8,92 \pm 19,65$ ng/ml vs. $2,71 \pm 3,57$ ng/ml. Doktorant słusznie zauważa, że może to wskazywać na istotną rolę tego peptydu w przebiegu chorób infekcyjnych płuc. Co ciekawe jednak, poziom tej katelicydiny był drastycznie niższy w grupie chorych z infekcją wywołaną przez wybrane drobnoustroje oportunistyczne (*Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* czy *Acinetobacter baumannii*), w porównaniu do wszystkich innych grup i wynosił $0,29 \pm 0,20$ ng/ml. Nasuwa się zatem pytanie o przyczynę takiej sytuacji. Doktorant wprawdzie stwierdza, że zakażenia oportunistyczne są charakterystyczne dla osób o obniżonej odporności, tutaj w domyśle

z obniżonym poziomem badanego peptydu, a jeśli tak – kolejnym pytaniem jest, czy w trakcie przeprowadzanych z uczestnikami eksperymentów wywiadów lekarskich bądź w efekcie wykonanych u nich testów biochemicznych i hematologicznych z zakresu laboratoryjnej diagnostyki medycznej pozyskano dane sugerujące lub potwierdzające obecność deficytów odporności. Jeśli w grupie osób z zapaleniem płuc wywołanym zakażeniem oportunistycznym poziom katelicyny LL-37 jest średnio niemal 10-krotnie niższy niż w grupie osób zdrowych to, czy zdaniem Doktoranta, można by upatrywać w tym peptydzie potencjalnego kandydata na czynnik wskaźnikowy upośledzenia układu odpornościowego? Uwagę wzbudzają bardzo wysokie wartości odchyień standardowych w większości grup badanych omawianej publikacji, niekiedy kilkukrotnie przewyższające wartości średnie poziomu peptydu LL-37. W czym należałoby upatrywać przyczyn takiego stanu rzeczy? Co ciekawe, w analogicznych/zbliżonych grupach badanych, opisanych we wcześniej przytoczonej pracy, takiego zjawiska nie odnotowano, np. grupy osób z zapaleniem płuc wywołanym Gram-dodatnimi ziarenkowcami - $13,94 \pm 5,13$ ng/ml vs. $5,25 \pm 19,25$ ng/ml. Potwierdzony w kolejnych publikacjach (*Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 2017, 3: 731-736 oraz artykuł zatwierdzony do druku w tym samym czasopiśmie) statystycznie znamienne wyższy poziom katelicyny LL-37 w grupie osób chorych na gruźlicę względem grupy kontrolnej, obejmującej zdrowych ochotników, słusznie upoważnia Doktoranta do wysunięcia trafnego wniosku, iż ocena stężenia tego peptydu w surowicy może być użytecznym/praktycznym wskaźnikiem rozwijającego się zakażenia wywołanego prątkiem gruźlicy. Intrygującą kwestią pozostaje, jak kształtuje się poziom katelicyny LL-37 u osób z zakażeniem latentnym *M. tuberculosis* oraz u zakażonych innymi drobnoustrojami pochodzenia bakteryjnego będącymi również wewnątrzkomórkowymi patogenami, np. *L. monocytogenes*. Doktorant stawia hipotezę, że obserwowany wzrost stężenia tego peptydu u chorych z aktywną gruźlicą jest pochodną wysokiej immunogenności określonych antygenów prątka, zwłaszcza tych będących komponentami ściany komórkowej, takich jak czynnik wiązkowy czy kwasy mykolowe, wchodzących w interakcje z układem odpornościowym gospodarza. Czy Doktorant mógłby pokrótce wyjaśnić na podstawie jakich przesłanek ta hipoteza została sformułowana?

Podsumowując, należy stwierdzić, że podlegająca ocenie dysertacja podejmuje aktualną tematykę zakażeń prątkiem gruźlicy w kontekście szczególnie interesującego i wciąż słabo rozpoznanego znaczenia katelicyny LL-37. Ilość i różnorodność pozyskanego materiału klinicznego podlegającego analizie świadczy o dobrej organizacji warsztatu pracy Doktoranta i jego umiejętności nawiązywania współpracy z jednostkami zewnętrznymi, w tym przypadku ze Szpitalem Chorób Płuc w Łodzi i Szpitalem Chorób Płuc

w Tuszynie. Wysoki procentowy udział Doktoranta w każdej z załączonych prac, wchodzących w skład cyklu publikacji, potwierdza Jego dużą pracowitość, zaangażowanie i opanowanie różnorodnych technik badawczych. Bardzo starannie i z dużą dbałością językową przygotowany opis, stanowiący komentarz do artykułów, będących podstawą rozprawy doktorskiej, oraz pozostały dorobek publikacyjny i konferencyjny, przekonują o dojrzałości naukowej Pana mgr. Karola Majewskiego. Wobec powyższego stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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 późn. zm.) i stawiam wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



dr hab. Marek Fol, prof. nadzw. UŁ