



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 01. 12. 2020

### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kornelii Gajek**

**Tytuł rozprawy: Analiza ekspresji receptorów TLR po allogenicznych przeszczepieniach szpiku u dzieci**

**Promotor: dr hab. n. med. Marek Ussowicz**

Zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z dnia 24 września 2020 r. o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Kornelii Gajek na temat „Analiza ekspresji receptorów TLR po allogenicznych przeszczepieniach szpiku u dzieci” mam przyjemność przedstawić następującą opinię.

Allogeniczny przeszczep komórek hematopoetycznych jest obecnie uznana i szeroko stosowaną metodą terapeutyczną zalecaną w przypadku schorzeń wynikających z zaburzeń hematopoezy. U dzieci, przeszczep allogeniczny wykonywany jest zazwyczaj w przypadku chorób nowotworowych, w tym białaczek, jak również wrodzonych niedoborów odporności lub chorób metabolicznych. Pomimo znacznej poprawy bezpieczeństwa i skuteczności tej metody terapeutycznej oraz ograniczenia jej skutków ubocznych, nadal dużym problemem są powikłania w postaci infekcji wirusowych oraz choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi. Receptory Toll-podobne (TLR), należące do grupy receptorów rozpoznających wzorce molekularne (PAMP), odgrywają ważną rolę zarówno w inicjowaniu wrodzonych i nabytych mechanizmów obronnych, jak i regulacji odpowiedzi odpornościowej poprzez wpływ na limfocyty T regulatorowe oraz równowagę Th1/Th2. Pełnią więc ważną rolę w aktywacji odbudowującego się układu odpornościowego u pacjentów po allogenicznym przeszczepie komórek hematopoetycznych.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej, mgr Kornelia Gajek podjęła się zbadania ekspresji receptorów TLR w komórkach NK i limfocytach T ulegających rekonstytucji po allogenicznym przeszczepie komórek hematopoetycznych (allo-HSCT) u dzieci oraz określenia zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych receptorów TLR, a zapadalnością na infekcje wirusowe oraz na chorobę przeszczep przeciwko



gospodarzowi. Ważną częścią pracy jest również określenie zależności pomiędzy wybranymi wariantami polimorficznymi w obrębie genów TLR, a występowaniem powikłań. Podjęcie takiej tematyki jest jak najbardziej uzasadnione, ze względu na mało dotąd poznany wpływ reakcji odpornościowych zależnych od TLR na występowanie powikłań po przeszczepie szpiku. Dodatkowo, ważnym elementem poznawczym przedstawionej pracy jest określenie częstości występowania receptorów TLR w limfocytach T i komórkach NK w trakcie rekonstrukcji układu odpornościowego po allo-HSCT u dzieci, które nie zostało wcześniej opisane.

Rozprawa liczy 129 stron druku i posiada układ typowy dla prac doświadczalnych – składa się z wykazu skrótów, wstępu, celu pracy, opisu materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i języku angielskim, bibliografii, materiałów uzupełniających oraz spisu rysunków i tabel. Pod względem redakcyjnym praca nie budzi zastrzeżeń, a proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są odpowiednio zachowane. Wykorzystanie bogatej bazy piśmiennictwa świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki oraz dojrzałym warsztacie badawczym Doktorantki.

We wstępie Doktorantka szczegółowo opisuje zagadnienie przeszczepu komórek hematopoetycznych poczynając od najnowszych osiągnięć w dziedzinie transplantacji poprzez omówienie rodzajów przeszczepów komórek hematopoetycznych, wskazań do allogenicznego przeszczepienia komórek hematopoetycznych u dzieci oraz procesu rekonstrukcji układu odpornościowego po przeszczepie allogenicznym. Dużo miejsca Doktorantka poświęciła również na dokładne omówienie powikłań występujących po przeszczepie allogenicznym ze szczególnym uwzględnieniem infekcji wirusowych oraz choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Następnie wyjaśniona została rola receptorów TLR w indukowaniu odpowiedzi odpornościowej, zdefiniowane ligandy dla poszczególnych TLR oraz omówione zostały szlaki sygnałowe inicjowane reakcją TLR-ligand i znaczenie polimorfizmów w obrębie genów kodujących receptory TLR. Wstęp kończy krótki rozdział podsumowujący znaczenie receptorów TLR po allogenicznym przeszczepie komórek hematopoetycznych.

Podsumowując, wstęp posiada edukacyjny charakter i stanowi solidne wprowadzenie w omawiane zagadnienie. W opinii recenzenta, w tej części pracy zabrakło jednak informacji na temat ekspresji TLR w limfocytach T. Omówienie dostępnej wiedzy na temat wpływu aktywacji szlaków sygnałowych przez TLR w poszczególnych subpopulacjach limfocytów T oraz czynników indukujących ekspresję TLR w tych komórkach byłoby dodatkowym uzasadnieniem podjętych badań.

Cele pracy przedstawione w postaci trzech punktów zostały dobrze dobrane i jasno sformułowane.

Rozdział „Materiały i Metody” zawiera szczegółowe informacje na temat grupy badawczej oraz technik laboratoryjnych wykorzystanych w badaniach. Do przeprowadzenia zaplanowanych badań Doktorantka wykorzystwała technikę cytometrii przepływową w celu



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

określenia ekspresji TLR na wybranych populacjach komórek oraz Real-Time PCR do oznaczenia polimorfizmów SNP w genach kodujących receptory TLR. Metoda cytometrii przepływowej umożliwiła określenie ekspresji wybranych receptorów TLR zarówno w limfocytach T, jak i komórkach NK bez wcześniejszej izolacji opisanych komórek. Dodatkową zaletą wybranej przez Doktorantkę metody oznaczenia TLR była również możliwość określenia tych receptorów w postaci funkcjonalnych cząsteczek. Zastanawia jednak, dlaczego Doktorantka, wykorzystując tak wszechstronną technikę, nie wykonała oznaczeń TLR na innych komórkach. Szczególnie wskazane w tym wypadku byłoby dodatkowe znakowanie antygenów CD8, CD4 i CD25, które umożliwiłoby ocenę odsetka komórek TLR+ wśród limfocytów T cytotoksycznych, T pomocniczych oraz T regulatorowych, a tym samym bardziej szczegółowe określenie mechanizmów związanych z zależną od TLR aktywacją tych komórek. Pewnego uszczegółowienia wymaga również opis oznaczenia bezwzględnej liczby komórek podczas analizy cytometrycznej. W jaki sposób został przeprowadzony taki pomiar, skoro w cytometrze FACS Canto nie ma możliwości bezpośredniego wyznaczenia gęstości analizowanej zawiesiny komórkowej?

Pomimo powyższych uwag, stwierdzam, że metodyka została opisana w sposób dokładny i szczegółowy, co dowodzi dobrej znajomości wykorzystanych technik. Rozdział został wzbogacony w tabele oraz schematy analiz wykonanych metodą cytometrii przepływowej ułatwiające śledzenie szczegółów wykonanych procedur. Zamieszczony opis metod statystycznych wskazuje natomiast, że analiza statystyczna została przeprowadzona w sposób prawidłowy. Na końcu rozdziału Doktorantka zamieściła wykaz odczynników i sprzętu stosowanych podczas prowadzonych badań.

Rozdział „Wyniki” został podzielony na 5 podrozdziałów. W części pierwszej opisu wyników Doktorantka przedstawiła dane dotyczące przebiegu odnowy limfocytarnej oraz zmian w ekspresji wybranych receptorów TLR (TLR2, TLR4, TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9) w grupie 55 pacjentów w okresie od 15 do 360 dnia po przeszczepie allogenicznym. Przedstawione zostały również wyniki określające wpływ kondycjonowania globuliną antytymocytarną (ATG) przed przeszczepem oraz źródła komórek hematopoetycznych na odnowę limfocytną i ekspresję receptorów TLR. Doktorantka zaobserwowała, że rekonstrukcja komórek NK, zgodnie z założeniami, przebiegała szybko (wartości referencyjne zostały osiągnięte już w 30 dniu), a na kinetykę odnowy nie miały wpływu zarówno stosowanie czynnika kondycjonującego, jak i pochodzenie komórek hematopoetycznych. W przypadku limfocytów T, definiowanych tutaj jako komórki CD45+CD3+, odnowa była znacznie wolniejsza w porównaniu do komórek NK, a wartości referencyjne odnotowano w 270 dniu. Doktorantka zaobserwowała również, że na kinetykę rekonstrukcji limfocytów T nie miało wpływu pochodzenie komórek hematopoetycznych. Natomiast, po kondycjonowaniu ATG do 120 dnia liczba limfocytów T we krwi była niższa niż w grupie, która nie otrzymała czynnika kondycjonującego. Jak słusznie Doktorantka podkreśla,



mogło to być spowodowane bezpośrednim wpływem ATG, które utrzymuje się w organizmie nawet do 3 miesięcy od podania.

Doktorantka wykazała ponadto, że kondycjonowanie wpływa na obniżenie liczby limfocytów wykazujących ekspresję receptorów TLR2/3/4/7/8, co przyczynia się do wyższej podatności na zakażenia oportunistyczne w tej grupie pacjentów. Ciekawa jest również obserwacja dotycząca kinetyki pojawiania się receptorów TLR2/4/9 zarówno w limfocytach T, jak i komórkach NK, co zdaniem Doktorantki może być przyczyną genetycznie zaprogramowanej kolejności ekspresji receptorów podczas rekonstrukcji lub środowiskowych uwarunkowań związanych z dużą ilością antygenów PAMP lub DAMP.

W następnej części Doktorantka opisuje zmiany zachodzące w ekspresji receptorów TLR pod wpływem infekcji wirusowych. Na początku określona została częstość występowania infekcji wirusami EBV, CMV, ADV i BKV. Sprawdzone również czy istnieje związek pomiędzy częstością występowania poszczególnych wirusów u pacjentów po allo-HSCT. Wyniki świadczące o aktywnej replikacji wybranych wirusów (wartości wirerii i wirurii u pacjentów po allo-HSCT) stanowiły kryterium podziału pacjentów na grupy w celu dalszej analizy zmian w ekspresji receptorów TLR w limfocytach T i komórkach NK. Doktorantka zaobserwowała istotnie statystyczną korelację ujemną pomiędzy częstością występowania TLR7 a wiracją i wirurią wirusa BKV. Natomiast w przypadku infekcji CMV Doktorantka wykazała związek ekspresji TLR3 na limfocytach T oraz TLR8 na komórkach NK z występowaniem wirerii CMV. Większość uzyskanych danych wskazuje na brak zależności pomiędzy ekspresją TLR, a zapadalnością na infekcje wirusowe. Jednak, jak sama Doktorantka podkreśla, przyczyną braku istotnych zmian może być niska częstość zakażenia wirusami u obserwowanych pacjentów spowodowana zastosowaniem wczesnego leczenia przeciwwirusowego oraz zbyt niska liczebność grup. W wielu przypadkach można jednak zaobserwować tendencje spadkowe występowania TLR na wybranych komórkach u pacjentów z infekcjami wirusowymi. Doktorantka trafnie reasumuje uzyskane wyniki wskazując na mechanizmy obronne indukowane przez wirusy w celu zmniejszenia skuteczności układu odpornościowego w rozpoznaniu infekcji wirusowej.

Kolejna część sekcji „Wyniki” dotyczy oceny zależności pomiędzy występowaniem TLR na limfocytach T i komórkach NK, a wystąpieniem ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Doktorantka zaobserwowała, że u pacjentów z rozwiniętą chorobą aGvHD występuje zwiększona częstość ekspresji TLR4 i 9 w limfocytach T we wczesnym okresie po przeszczepie. Dyskutując uzyskane wyniki Doktorantka podnosi, że pod wpływem cyklosporyny A stosowanej profilaktycznie po przeszczepie w celu zapobiegania aGvHD jednym z jej efektów jest działanie upośledzające reaktywność limfocytów na stymulację poprzez wybrane receptory TLR, w tym TLR4 i 2. Zwiększona częstość występowania tych receptorów na limfocytach T może być przyczyną niewystarczającej immunosupresji i wrażliwości limfocytów T na pobudzenie przez ligandy dla tych receptorów. Czy w związku z tak postawionym założeniem, istnieje możliwość ochrony pacjentów przed wystąpieniem



aGvHD poprzez monitorowanie zmian w ekspresji TLR w limfocytach T? Ciekawym elementem pracy jest również dyskusja na temat roli TLR9 w występowaniu aGvHD. Jak podkreśla Doktorantka, wyniki które uzyskała są sprzeczne z innymi wynikami, wskazującymi na rolę ochronną TLR9 przed wystąpieniem aGvHD. Z uwagi na to, że TLR9 ma znaczenie w stymulacji układu odpornościowego gospodarza przez jelitowy mikrobiom, nasuwa się tutaj pytanie jaka jest rzeczywista rola mikrobiomu u pacjentów po allo-HSCT w aktywacji limfocytów przez TLR9 i w jaki sposób na indukcję aGvHD wpływa mikrobiom zmieniony pod wpływem zastosowanego leczenia?

W ostatniej części Doktorantka przedstawiła wyniki określające związek pomiędzy polimorfizmami w genach kodujących receptory TLR a infekcjami wirusowymi i wystąpieniem ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Do genotypowania wybrano 8 miejsc polimorficznych obecnych w genach receptorów TLR3/7/8/9, a do badań zakwalifikowano 92 pacjentów, których podzielono na grupy pod kątem występowania aktywnej replikacji wybranych wirusów bądź wystąpienia objawów aGvHD. Na uwagę zasługuje szeroki panel wykonanych badań. Doktorantka zaobserwowała, że u pacjentów, u których wystąpiły infekcje CMV - w dwóch miejscach - i infekcje ADV - w jednym miejscu polimorficznym genu receptora TLR8 znacząco częściej występowała forma zmutowana, która odpowiada za powstanie białka o zmienionej funkcjonalności, co w rezultacie może prowadzić do zwiększonej podatności na infekcje wirusami CMV i ADV. W przypadku sześciu z ośmiu wybranych wariantów polimorficznych Doktorantka nie obserwowała związku polimorfizmów w genach receptorów TLR3/7/8/9 zarówno pomiędzy infekcjami wirusowymi, jak i występowaniem choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Uwagę zwraca wybór receptorów TLR zakwalifikowanych do badań, gdyż nie uwzględniono tutaj żadnego z badanych wcześniej receptorów zlokalizowanych w błonie komórkowej. Czy jest jakiś powód, dla którego badania ograniczono do wewnątrzkomórkowych receptorów TLR?

Podsumowując, rozdział „Wyniki” stanowi najobszerniejszą część pracy obejmującą 18 rysunków i 21 tabel (wraz z tabelami zamieszczonymi w sekcji „Materiały uzupełniające”). Chociaż wyniki w większości zostały opisane i zaprezentowane w sposób prawidłowy i czytelny, mam kilka uwag dotyczących tego rozdziału, które wymagają dodatkowego komentarza Doktorantki:

- o Doktorantka stosuje zamiennie, zarówno w opisie wyników, jak i dyskusji, sformułowania „ekspresja TLR w komórkach” i liczba, odsetek komórek „wykazujących ekspresję receptorów TLR”. Należy podkreślić, że w kontekście zaprezentowanych wyników tylko to drugie sformułowanie jest prawidłowe, bowiem analizowana była liczba, bądź odsetek komórek wykazujących ekspresję wybranych receptorów TLR, a nie intensywność fluorescencji wskazująca na poziom ekspresji danego receptora w wybranej populacji komórek. Z tego powodu trudno zgodzić się z następującymi stwierdzeniami stanowiącymi



krótkie podsumowanie wyników w części „Dyskusja”: „W przypadku wszystkich analizowanych receptorów, ich ekspresja była dziesięciokrotnie wyższa w limfocytach niż komórkach NK” oraz „... wykazuje różnice istotne statystycznie w ekspresji receptorów TLR2, TLR3 i TLR7 w limfocytach T oraz TLR2, TLR4 i TLR7 w komórkach NK”.

- Rysunki 9 i 10 przedstawiające dane o liczbie i odsetku komórek T i NK wykazujących ekspresję wybranych receptorów TLR powinny zawierać dane dla 55 pacjentów, jak wynika z opisu zamieszczonego w rozdziale „Materiały i Metody. Z zaprezentowanych danych wynika jednak, że w niektórych przypadkach, np. na wykresach przedstawiających zmiany w liczebności i odsetku komórek wykazujących ekspresję TLR3/8/9, liczba przeanalizowanych prób była znacznie mniejsza. Powody zmniejszonej liczebności grup powinny być omówione w opisie wyników.
- w podpisie pod Rysunkiem 9 i 10 Doktorantka wskazuje, że czerwona linia na wykresach przedstawia medianę, podczas gdy, wyraźnie widać, że nie jest to wartość środkowa (przykładowo rysunki 9A, 9B, 9E, 9F).
- wymaga również wyjaśnienia, dlaczego na niektórych wykresach nie zostały przedstawione wszystkie punkty czasowe np. Rys. 9 K, L, Rys. 10 K, L
- na Rysunku 12 A (120 i 270 dzień) istotności statystyczne zostały zaznaczone w punktach, dla których nie widać różnic (punkty są w tym samym miejscu, bądź bardzo blisko siebie) oraz brak istotności w punktach znacznie od siebie oddalonych. W opinii recenzenta, na wykresach przedstawiających kinetykę zmian wybranych wartości dla dwóch niezależnych grup powinny być zamieszczone odchylenia, które pomogłyby rozwiązać tego typu wątpliwości.
- w podpisach pod rysunkami brakuje informacji o zastosowanych testach statystycznych oraz liczebności grup. Umieszczenie takich informacji w podpisach ułatwiłoby śledzenie wyników, tym bardziej, że zmienność w liczebności poszczególnych grup jest znaczna.
- opis wyników powinien zawierać wyjaśnienie, dlaczego w niektórych przypadkach, np. u pacjentów z aktywną wirurią ADV, kinetyka zmian liczby limfocytów T i komórek NK wykazujących ekspresję TLR nie została przedstawiona w pełnym zakresie od 15-180 dnia, a tylko dla wybranych punktów czasowych.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka w sposób zwięzły i rzeczowy skonfrontowała uzyskane wyniki z dostępnym piśmiennictwem, wykazując się zdolnością kojarzenia faktów i dobrą znajomością piśmiennictwa opisującego zagadnienie. Oprócz dyskusji uzyskanych wyników z doniesieniami opublikowanymi przez inne zespoły, w rozdziale tym Doktorantka



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

wskazała również problemy wymagające dalszych badań oraz możliwości wykorzystania zdobytej wiedzy.

W ogólnej ocenie merytorycznej stwierdzam, że postawione przez Doktorantkę cele zostały prawidłowo zrealizowane, a wnioski poparte są starannie zaplanowanymi i wykonanymi doświadczeniami. Doktorantka wykazała się również znajomością aktualnego stanu wiedzy w temacie badań oraz w sposób poprawny i wyważony interpretowała uzyskane wyniki. Do ważniejszych elementów rozprawy zaliczam niewątpliwie badanie wpływu polimorfizmów w genach receptorów TLR na wystąpienie infekcji wirusowych i choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie w planowaniu leczenia profilaktycznego stosowanego u pacjentów po przeszczepie.

Na podstawie przeprowadzonej analizy rozprawy mgr Kornelii Gajek stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Niniejsza praca stanowi oryginalne opracowanie, które poszerza wiedzę na temat zmian w ekspresji receptorów TLR u dzieci po allogenicznym przeszczepie komórek hematopoetycznych. Uzyskane wyniki wnoszą nie tylko element poznawczy, ale również mogą mieć znaczenie praktyczne w profilaktyce powikłań u pacjentów po allo-HSCT. W związku z powyższym, wnioskuję o dopuszczenie mgr Kornelii Gajek do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

*dr hab. Joanna Rosowska*  
*Joanna Rosowska*  
Kierownik Międzyzakładowej Pracowni  
Cytometrii i Mikroskopii Konfokalnej IITD PAN