

Prof. dr hab. Anna Winnicka, prof. zw.

Warszawa, dnia 12.10.2018

Zakład Patofizjologii Zwierząt

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

SGGW, Warszawa

## RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Anny Marzec-Grządziel

pt. „Wpływ inhibitorów TNF- $\alpha$ , IL-6 i MAPKs na przeżywalność oraz przebieg procesów zapalnych u myszy zakażonych wirusem wścieklizny.”

Ocenę pracy, wykonanej w Zakładzie Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem promotora dr. hab. Marcina Smreczaka i promotora pomocniczego dr inż. Anny Orłowskiej, dokonano na zlecenie Rady Naukowej PIWet-PIB zgodnie z uchwałą z dnia 27.04.2016 roku, na podstawie materiałów przekazanych przez Przewodniczącego Komisji Doktorskiej prof. dr. hab. Dariusza Bednarka (nr pisma BRN-410/8/18).

Wścieklizna (*rabies*, *lyssa*), choroba wirusowa znana od kilku tysięcy lat, nadal powoduje rocznie około 60 tysięcy zgonów, z czego prawie połowę stanowią dzieci, w ponad 150 państwach głównie Azji i Afryki. W zdecydowanej większości przypadków do zakażenia dochodzi po pogryzieniu przez psa, stąd kluczowym czynnikiem zapobiegającym szerzeniu się tej choroby są szczepienia zwierząt oraz przed- i poekspozycyjna ochrona ludzi. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2017 roku tych właśnie szczepień wykonywanych jest około 15 milionów rocznie. Pod auspicjami WHO, Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światowego Sojuszu na rzecz Kontroli Wścieklizny (GARC) powstała organizacja "Zjednoczeni przeciw wścieklicznie", która za cel działania postawiła do 2030 roku stworzenie wspólnej strategii postępowania i wyeliminowania przypadków śmiertelnych tej choroby.

Ponieważ okres inkubacji choroby u zwierząt trwa od kilku dni do ponad 7 lat, a wścieklizna może przybierać różne postaci i występować z różnym natężeniem objawów,

dlatego wg zaleceń Głównego Inspektoratu Weterynarii „należy bezwzględnie unikać kontaktu z podejrzanym zwierzęciem i nie dotykać zwłok zwierząt podejrzanych”. Postępowanie Inspekcji Weterynaryjnej w przypadku podejrzenia lub stwierdzenia wścieklizny opisane jest w ustawie z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt a także w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 7 stycznia 2005 r. w sprawie zwalczania wścieklizny. Obowiązkowi szczepienia podlegają psy powyżej 3. miesiąca życia, a na obszarach występowania wścieklizny zalecane są również szczepienia kotów, a także zwierząt gospodarskich, jeśli mogą mieć one kontakt z dzikimi zwierzętami, takimi jak: lis, jenot czy kuna. Zważywszy, że w Polsce rezerwuarem wirusa wścieklizny jest lis rudy, zgodnie z rozporządzeniem Ministra z dnia 17 grudnia 2013 r. na obszarach o największym ryzyku wystąpienia wścieklizny Inspekcja Weterynaryjna prowadzi szczepienia lisów wolno żyjących. Biuletyn Wścieklizny WHO podaje, że na terenie Polski w 2017 roku stwierdzono 9 przypadków wystąpienia wścieklizny u zwierząt dzikich. Natomiast Biuletyn Głównego Inspektoratu Weterynarii w dokumencie o stanie chorób zakaźnych w 2017 roku wskazuje na aż 8 przypadków wścieklizny u nietoperzy. Przedstawione fakty są dowodem, że prowadzenie badań naukowych nad patogenezą wścieklizny i sposobami postępowania w zakażeniu wirusem wścieklizny jest celowe z naukowego punktu widzenia, ale także bardzo potrzebne w praktyce klinicznej.

Rozszerzanie wiedzy o mechanizmach reakcji obronnych w zakażeniach wirusowych, w tym wirusem wścieklizny poprzez wykazanie następstw nadmiernej, niszczącej odpowiedzi immunologicznej gospodarza skupia aktualnie uwagę wielu badaczy. Do związków mających potencjalnie największe możliwości w procesie blokowania szlaków przekazywania sygnałów przez cytokiny prozapalne należą preparaty wyprodukowane na bazie przeciwciał monoklonalnych. Produkcja przeciwciał, od czasów Milsteina i Köhlera, którzy w 1975 roku po raz pierwszy zaprezentowali możliwość wykorzystania przeciwciał skierowanych do określonych antygenów w diagnostyce i leczeniu, w ostatnich latach rozwinęła się do skali przemysłowej. Początkowo bardziej bezpieczne było wykorzystanie produktów jednej linii limfocytów B do rozpoznawania określonych epitopów na powierzchni komórek *in vitro*, co określane jest mianem immunofenotypowania. Wkrótce jednak nastąpiła era wykorzystania przeciwciał monoklonalnych jako leków, o czym donoszą liczne publikacje i świadczą rejestracje produktów leczniczych. Początkowo znalazły zastosowanie: humanizowane przeciwciało monoklonalne anti-CD52 na limfocytach T i monocytach w leczeniu stwardnienia rozsianego (SM, alemtuzumab - hamuje wystąpienie rzutów choroby i zmniejsza

stopień niesprawności chorych), przeciwciała anti-CD25 (daclizumab - immunosupresor) czy anti-integryna alfa 4 (natulizumab - do leczenia SM zarejestrowany w 2004 r. przez amerykański Urząd ds. Żywności i Leków i w 2006 r. na terytorium Unii Europejskiej). Bardzo wcześnie uznanie zyskał rytuksymab, ludzko-mysie przeciwciała anti-CD20, stosowane w leczeniu: chłoniaków nieziarniczych, przewlekłej białaczki limfocytowej i reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Podobnie, pomocny okazał się trastuzumab - rekombinowane, humanizowane przeciwciała łączące się wybiórczo z receptorem ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2, stosowane w leczeniu raka piersi.

Badania nad powierzchniowymi białkami supresyjnymi na komórkach układu immunologicznego, które zablokowane przez swoiste przeciwciała monoklonalne przestają wykazywać działanie hamujące w stosunku do tych komórek docenił Komitet Noblowski honorując w bieżącym roku prof. J.P. Allisona, który wykrył supresorowe białko CTLA-4 na limfocytach T. Podanie chorym przeciwciała anti-CTLA-4 (zarejestrowanego w USA jako ipilimumab) pomogło w wyleczeniu chorych na zaawansowanego, przerzutowego czerniaka. Drugi laureat tegorocznej Nagrody Nobla prof. Tasuku Honjo odkrył inne białko supresorowe - PD-1, które zablokowane swoistym przeciwciałem monoklonalnym (niwolumab i pembrolizumab) pozwala komórkom układu immunologicznego gospodarza podjąć skuteczną walkę z czerniakiem i rakiem płuc.

Zważywszy, że w następstwie zakażenia wirusem wścieklizny dochodzi do nadekspresji cytokin prozapalnych i rozwoju zapalenia, co w istotny sposób zwiększa ryzyko śmierci, na uwagę zasługuje możliwość wykorzystania przeciwciał blokujących cytokinowe szlaki przekazywania sygnału. W leczeniu już znalazł zastosowanie infliksymab - chimerowe przeciwciała monoklonalne IgG<sub>1</sub> (Remsima), które wykazuje duże powinowactwo do czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ ), przez co hamuje aktywność tej cytokiny *in vitro*. *In vivo* tworzy stabilne kompleksy z ludzkim TNF- $\alpha$ , dlatego stosowany w RZS zmniejsza nacieki komórek do stawów objętych zapaleniem, a także ekspresję cząsteczek odpowiedzialnych za adhezję i chemotaksję komórek oraz degradację tkanek. Po leczeniu infliksymabem następuje obniżenie stężenia IL-6 i białka C-reaktywnego (CRP), a zwiększenie stężenia hemoglobiny u pacjentów z niedokrwistością. W chorobie Leśniowskiego-Crohna leczenie infliksymabem powoduje obniżenie stężenia CRP i zmniejszenie napływu komórek zapalnych do obszarów jelit dotkniętych chorobą. Infliksymab stosowany w łuszczycy także zmniejsza nasilenie zapalenia naskórka i normalizuje różnicowanie keratynocytów w blaszkach łuszczycowych.

Inne rekombinowane humanizowane przeciwciała monoklonalne IgG1 - tocilizumab, wiąże się swoiście z cytoplazmatycznymi i błonowymi receptorami IL-6 (sIL-6R i mL-6R), przez co hamuje przekazywanie sygnału szlakiem, w którym te receptory pośredniczą. U osób z RZS stosowanie tocilizumabu w 2. tyg. zmniejsza stężenie CRP i osoczowego amyloidu A oraz zmniejsza szybkość opadania krwinek czerwonych (OB.). Na uwagę zasługuje także sorafenib - inhibitor licznych kinaz: serynowo-treoninowych i tyrozynowych wykazujący zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* działanie przeciwproliferacyjne i przeciwingiogenne. Hamuje on wzrost ludzkich guzów nowotworowych i angiogenezę poprzez hamowanie aktywności docelowych enzymów i/lub czynników zlokalizowanych w komórkach guza (np. CRAF, BRAF, V600E BRAF, c-KIT, FLT-3) oraz w jego unaczynieniu (np. CRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGRF- $\beta$ ). Recenzowana praca wyjątkowo dobrze wpisuje się w ten nowatorski nurt badań. O randze dokonań zespołu badaczy, w skład którego wchodzi mgr Anna Marzec-Grządziel, z Zakładu Wirusologii PIWet-PIB w Puławach współpracujących z naukowcami holenderskimi i niemieckimi, świadczą ich ubiegło- i tegoroczne publikacje na łamach prestiżowego czasopisma „Vaccine”. Wymienione prace dotyczą m.in. wykorzystania inhibitorów cytokin jako leki oraz inhibitorów wskaźników apoptozy i pyroptozy w badaniu patogenezy wścieklizny na modelu mysim.

Rozprawa doktorska mgr Anny Marzec-Grządziel została przygotowana w układzie klasycznym. Prezentowany materiał został właściwie dobrany, podzielony na rozdziały, tworząc przemyślany, logiczny ciąg informacji. Praca zawiera wszystkie elementy niezbędne do udokumentowania przeprowadzonych badań, precyzyjne opisy nowoczesnej, właściwie dobranej metodyki. Rozprawa liczy 105 stron, w tym 12 tabel i 17 rycin oraz 230 pozycji piśmiennictwa. W manuskrypcie nie zostały wskazane źródła finansowania badań. Należy stwierdzić, że zarówno wybór tematu, jak i organizacja prowadzonych eksperymentów a także staranna forma dysertacji zasługują na uznanie.

We „Wstępie” Autorka w sposób zwięzły, rzeczowy odniosła się do kluczowych zagadnień uzasadniających podjęcie tematu, tj. opisała cykl życiowy wirusa, zagrożenia z tytułu narażenia ludzi na zarażenie wirusem wścieklizny i następstwa nadmiernej odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. Wyjaśniła ponadto różnice w patogenezie zakażeń wirusem wścieklizny w zależności od szczepu: atenuowanego, laboratoryjnego i terenowego, a także dokonała przeglądu najnowszych sposobów leczenia wścieklizny. Pozwoliło to na postawienie śmiałej hipotezy, że zablokowanie cytokinowego szlaku przekaźnictwa sygnału w rozwoju odpowiedzi immunologicznej obniży śmiertelność myszy

zakażonych wirusem wścieklizny. Szczegółowe cele recenzowanej pracy obejmowały sprawdzenie jaki wpływ wywierają inhibitory TNF- $\alpha$  (Remicade, Jansen Biologics B.V.), IL-6 (RoActemra, Roche Registration Limited) i MAP kinaz (Nexavar, Bayer Pharma AG) na przeżywalność oraz rozwój zapalenia u myszy zakażonych wirusem wścieklizny. Do badań, na które Autorka posiadała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach, wykorzystano 66 myszy w 7 grupach, gwarantujących właściwe kontrole. Na uwagę zasługuje zarówno elegancka, jasna konstrukcja eksperymentu opierająca się na: zbadaniu miana wirusa, liczby kopii genu *N* dla wirusowego białka nukleoproteidy i zbadaniu poziomu ekspresji genów (*tnf $\alpha$* , *il6*, *casp3*, *cycs*, *bcl2*, *mcl1*, *jnk3*) kodujących wybrane białka, jak i sposób przeprowadzenia rozbudowanej analizy statystycznej wyników, pozwalającej na wyprowadzenie rzeczowych wniosków.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka potwierdziła hipotezę odnośnie wydłużenia przeżywalności myszy szczepu C57BL/6 zakażonych wirusem wścieklizny SHBRV-18, którym podano trzy inhibitory wybranych szlaków immunologicznych zaangażowanych w odpowiedź organizmu na to zakażenie. Ważnym, oryginalnym spostrzeżeniem Autorki było stwierdzenie oddziaływania przeciwciał monoklonalnych – inhibitorów w szczególności TNF- $\alpha$ , ale także IL-6 i MAP kinaz na funkcje komórek, wyrażające się produkcją cytokin, bez wpływu na namnażanie wirusa. W końcowych wnioskach z przeprowadzonych badań ekspresji markerów czynników pro- i antyapoptotycznych na poziomie transkrypcyjnym Autorka podkreśliła także, że w przebiegu przeprowadzonego zakażenia wysoce zjadliwym szczepem wirusa wścieklizny (SHBRV-18) apoptoza nie odgrywa istotnej roli.

Cała dokumentacja przeprowadzonych badań nie budzi zastrzeżeń. Jednak jako recenzenta, zobowiązanego do starannej analizy zarówno merytorycznej jak i formalnej otrzymanego do oceny manuskryptu, zwrócił moją uwagę fakt, że:

1. we fragmencie „Dyskusji” poświęconym cytokinom na str. 73 Autorka powołuje się na kluczowy podręcznik na polskim rynku z tego zakresu pt. „Immunologia” (pod red. profesorów: J. Gołąb, M. Jakóbisiak, W. Lasek, T. Stokłosa) wydany przez PWN w roku 2002. Zważywszy, że postęp, wyrażający się liczbą publikacji i nagród, w zakresie nauk o układzie odpornościowym nie ma sobie równych, dlatego należałoby raczej odwoływać się do najnowszego wydania tego podręcznika z 2017 roku,

2. w rozdziale „Piśmiennictwo” na str. 90 znalazła się pozycja autorów: Blood T., Barrier B., Daneman R., Prat A. z 2015 roku. pt. „The Blood - Brain Barrier”. Praca ta została zacytowana na str. 69 jako „Blood i in., 2015”. Autorami tej publikacji są Richard Daneman i Alexandre Prat,
3. jako niezgrabne językowo uważam określenie zawarte w tytule pracy – „przebieg procesów zapalnych”, co zastąpiłabym - za medycznym słownikiem Dorlanda definiującym, że „Zapalenie jest reakcją obronną unaczynionej tkanki łącznej na czynniki uszkodzające”, sformułowaniem „przebieg zapalenia”. Inne drobne uwagi semantyczne to sformułowania: „opracowanie rany” i „opracowanie skutecznej terapii” sąsiadujące ze sobą w streszczeniu na str. 85, nadużywanie słowa „infekcja” zamiast „zakażenie” czy określenie „procesy komórkowe” we wnioskach na str. 81, Wymienione drobne uwagi formalne stanowią głos w dyskusji nad rozprawą i nie obniżają wysokiej wartości zaprezentowanej pracy.

W podsumowaniu opinii na temat rozprawy doktorskiej mgr Anny Marzec-Grządziel należy podkreślić zasadnicze walory pracy, do których należą przede wszystkim:

1. wyjątkowo trafny wybór tematu badawczego podyktowany próbą rozwiązania realnego problemu epizootycznego i terapeutycznego, jakim jest zakażenie wirusem wścieklizny,
2. trudna metodyka badań przy posługiwaniu się wirusem wścieklizny oraz technikami przy badaniu poziomu ekspresji wybranych genów (qPCR), rzetelna analiza statystyczna, wartościowe i dojrzałe przeprowadzone omówienie wyników,
3. istotny wkład do nauk podstawowych - poprzez stwierdzenie użyteczności blokowania określonych szlaków przekazu sygnału w rozwoju nadmiernego i szkodliwego zapalenia w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie wirusem wścieklizny. Jednocześnie wyniki badań cechuje wysoki potencjał aplikacyjny dzięki wykazaniu przydatności preparatów o charakterze przeciwciał monoklonalnych (Remicade, RoActemra, Nexavar) do wydłużenia czasu przeżycia zwierząt zakażonych SHBRV-18.

Przedstawiona do oceny praca mgr Anny Marzec-Grządziel stanowi znaczny dorobek naukowy Autorki, spełnia wymagania stawiane pracom na stopień doktora nauk i w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dn. 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz.595

z późniejszymi zmianami). Zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z wnioskiem o dopuszczenie mgr Anny Marzec-Grządziel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Almunielug*

Prof. dr hab. Anna Winnicka, prof. zw.

Warszawa, dnia 12.10.2018

Zakład Patofizjologii Zwierząt

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

SGGW, Warszawa

## WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY

Zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej mgr Anny Marzec-Grządziel pt. „Wpływ inhibitorów TNF- $\alpha$ , IL-6 i MAPKs na przeżywalność oraz przebieg procesów zapalnych u myszy zakażonych wirusem wścieklizny.”

Dzięki zastosowaniu preparatów o charakterze przeciwciał monoklonalnych do zablokowania szlaków sygnalizacyjnych w rozwoju zapalenia w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie wirusem wścieklizny pracę cechuje wysoki stopień innowacyjności w zakresie poznawania mechanizmów patogenezы choroby i znaczny potencjał aplikacyjny w zakresie możliwości terapeutycznych. Sposób prezentacji wyników wraz z ich omówieniem zasługuje na uznanie.

Cztery publikacje zespołu prof. Marcina Smreczaka z roku 2017 i 2018 na łamach „Vaccine” bezpośrednio i pośrednio związane z tematyką rozprawy doktorskiej są najlepszym potwierdzeniem wysokiej wartości merytorycznej prezentowanych zagadnień. Udział doktorantki w licznych, międzynarodowym zespole świadczy ponadto o Jej dobrym przygotowaniu w zakresie warsztatu badawczego.

