

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
Zakład Mikrobiologii
Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy
Kierownik Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec
01-138 Warszawa ul. Płocka 26
Tel. + 22 4312182, e- mail: e.kopec@igichp.edu.pl



Warszawa 20.08.2022 r.

Prof. dr hab. n.med Ewa Augustynowicz-Kopec
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
Zakład Mikrobiologii

Recenzja

pracy doktorskiej

lekarza Bartłomieja Rękawieckiego pod tytułem
„Analiza porównawcza polimorfizmu genów FCGR w sarkoidozie i gruźlicy płuc”

Różnicowanie pomiędzy sarkoidozą (SA) a gruźlicą (TB) nadal stanowi ogromne wyzwanie. Wynika to przede wszystkim z faktu, że zarówno sarkoidoza jak i gruźlica są chorobami ziarniniakowymi, a ich główne symptomy dotyczą niespecyficzných objawów ogólnoustrojowych, takich jak gorączka, zmęczenie, złe samopoczucie i utrata masy ciała. Chociaż płuca są najczęstszymi miejscami lokalizacji obu chorób to zarówno gruźlica jak i sarkoidoza może obejmować również postaci pozapłucne w tym między innymi: skórę, węzły chłonne, serce, śledzionę, wątrobę i układ nerwowy.

Rozpoznanie sarkoidozy poparte jest obrazem klinicznym, ujemnym wynikiem testu tuberkulinowego, ujemnymi wynikami badań mikrobiologicznych w kierunku

Mycobacterium tuberculosis, nieserowaciejącym ziarniniakiem oraz prawidłową odpowiedzią chorego na leczenie kortykosteroidami. Jednak cechy histopatologiczne są zwykle niewystarczające do rozpoznania choroby. Często trudno jest odróżnić sarkoidozę od gruźlicy, zwłaszcza gdy nie obserwuje się charakterystycznej dla TB martwicy serowatej, a barwienie materiału od chorego w kierunku prątków kwasoopornych jest ujemne. W badaniach dotyczących czynnika etiologicznego sarkoidozy stwierdzano obecność DNA prątków gruźlicy w ziarniniaku sarkoidalnym, co sugerowało wcześniejszą ekspozycję chorego na prątki, która mogła spowodować reakcję ziarniniakową. Wielu badaczy sugeruje, że ziarniniakowe zapalenie w sarkoidozie jest spowodowane obecnością antygeny *Mycobacterium tuberculosis*.

Istnieje pilna potrzeba lepszej diagnostyki różnicowej pomiędzy sarkoidozą a TB co pozwoli na szybsze diagnozowanie chorych. Wiele uwagi poświęca się badaniom genetycznym, w tym badaniom określającym w jaki sposób genotyp determinuje obraz kliniczny choroby. Lepsze zrozumienie procesów chorobowych może doprowadzić do opracowania skutecznych metod walki z TB i SA.

Z dużym zainteresowaniem podjęłam się recenzji pracy doktorskiej magistra Bartłomieja Rękawieckiego, która dotyczy bardzo istotnego nurtu prowadzonych obecnie na świecie badań obejmujących poszukiwania specyficznych biomarkerów, umożliwiających różnicowanie pomiędzy sarkoidozą a gruźlicą.

Wybór tematu pracy przez Doktoranta należy ocenić wysoko, jako zasadny naukowo i pożądanym ze względu na aplikacyjny charakter uzyskanych wyników. Promotorem pracy jest Prof. Anna Dubaniewicz z Kliniki Pneumonologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wybitna specjalistka zagadnień związanych z diagnostyką różnicową sarkoidozy i gruźlicy, która jako pierwsza na świecie w swoich badaniach wykazała, że to nie prątek gruźlicy, a jego antygeny wywołują różną odpowiedź immunologiczną u osób z odmiennym podłożem genetycznym, HLA i spoza-HLA (SLC11A1, FCGR), wywołując rozwój sarkoidozy lub gruźlicy.

Układ pracy jest typowy, zawiera wszystkie rozdziały przyjęte zwyczajowo w pracach doktorskich. We wstępie Doktorant przedstawił historię badań nad sarkoidozą i gruźlicą, ich epidemiologię, klinikę oraz czynniki mogące predysponować do zachorowania.

Chciałabym podkreślić, że wprowadzenie napisane jest przez Doktoranta w sposób zwięzły, mimo że zakres tematyczny wstępu jest bardzo szeroki. Po przeczytaniu wstępu jasne stają się ogólne cele pracy, a wybór celów dodatkowych dobrze uzasadniony.

Celem badań zaplanowanych w pracy było poszukiwanie molekularnego markera, który umożliwiłby różnicowanie pomiędzy sarkoidozą a gruźlicą ze względu na ich podobieństwo obrazu klinicznego, histopatologicznego i radiologicznego umożliwiając tym samym uniknięcia błędnej diagnozy chorego.

Cel ten zrealizowano w pracy poprzez analizę porównawczą polimorfizmu genów FCGR2A (H131R), FCGR2B (I232T), FCGR2C (X57Q), FCGR3A (F158V) i FCGR3B (NA1/NA2/SH), które kodują receptory Fcγ klasy II i III oraz są odpowiedzialne za usuwanie kompleksów immunologicznych i zopsonizowanych patogenów. Zaplanowane w niezwykle ciekawy sposób badania miały umożliwić uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania:

- Czy występowanie poszczególnych wariantów polimorficznych genów FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A oraz FCGR3B zwiększa ryzyko rozwoju sarkoidozy płuc i ma wpływ na jej przebieg w populacji mieszkańców Polski północnej?
- Czy występowanie poszczególnych wariantów polimorficznych genów FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A oraz FCGR3B zwiększa ryzyko rozwoju gruźlicy płuc w populacji mieszkańców Polski północnej?
- Czy istnieją różnice w częstości występowania poszczególnych wariantów polimorfizmu genów FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A oraz FCGR3B pomiędzy chorymi na sarkoidozę i gruźlicę płuc?
- Czy liczba kopii poszczególnych genów FCGR ma wpływ na zwiększone ryzyko zachorowania na sarkoidozę i gruźlicę?
- Czy istnieją różnice w liczbach kopii poszczególnych kopii genów FCGR u osób chorych na sarkoidozę i gruźlicę płuc?

Cele pracy zostały sformułowane w sposób przejrzysty i jasno wytyczają kierunek prowadzenia badań.

Materiał do badań stanowiła krew żylna obwodowa pochodząca od 154 chorych na sarkoidozę (38 w I stadium, 60 w II, 35 w III i 21 chorych w IV stadium choroby) i 179 chorych na gruźlicę płuc. Grupę kontrolną stanowiło 148 zdrowych ochotników.

Przeprowadzone przez Doktoranta badania wykazały, różnice w obecności poszczególnych genotypów genu FCGR2A między chorymi na sarkoidozę, chorymi na gruźlicę a osobami zdrowymi. W grupie chorych na SA u nosicieli genotypu 131HR stwierdzono mniejsze ryzyko rozwoju III stadium choroby. Genotyp ten identyfikowano częściej w grupie chorych w stadiach I i II SA. Nie wykazano różnic w częstości występowania alleli i genotypów genu FCGR2A pomiędzy chorymi na TB i zdrowymi osobami.

Wyniki analizy porównawczej genu FCGR2C pomiędzy chorymi na SA i TB wykazały, istotnie statystycznie częstszą obecność allelu 57X i genotypu 57XX w SA a allelu 57Q i genotypu 57XQ w grupie chorych na TB. Różnice te w częstości występowania polimorfizmów genu FCGR2C mogą powodować odmienną etiopatogenezę w przebiegu sarkoidozy i gruźlicy.

Badania genu FCGR3A wykazały istotnie statystycznie częstsze występowanie genotypu 158FF u chorych na SA w porównaniu do chorych na TB oraz rzadsze występowanie genotypu 158FF i 158FV u chorych na SA. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant stwierdził, że występowanie genotypu 158FV koreluje z mniejszym ryzykiem zachorowania na SA. Stwierdzony w pracy polimorfizm V158F genu u chorych na TB może wpływać na zwiększoną w tej grupie liczbę funkcjonalnych receptorów FcγRIIIa, fagocytozę *Mycobacterium tuberculosis*, cytotoksycznością komórkową zależną od przeciwciał oraz wytwarzanie cytokin prozapalnych przez komórki NK i limfocyty Tγδ. Przeprowadzona w pracy analiza porównawcza genu FCGR3A pomiędzy dwoma grupami chorych, tj. chorymi na SA i TB wykazała istotnie statystycznie większą częstość występowania homozygot 158FF i rzadszą heterozygot 158FV w sarkoidozie, niż w gruźlicy. W związku z tym polimorfizm V158F, zwłaszcza genotyp 158FV, może okazać się pomocny jako biomarker w różnicowaniu tych dwóch jednostek chorobowych.

Wyniki analizy polimorfizmu NA1/NA2/SH genu FCGR3B wykazały istotnie statystycznie częstsze występowanie allelu SH oraz genotypów NA1/SH i NA2/NA2 w grupie chorych na sarkoidozę oraz istotnie statystycznie mniejszą liczbę chorych ze zidentyfikowanym genotypem NA1/NA2 w porównaniu z chorymi na gruźlicę. Może to powodować większą liczbę mniej funkcjonalnych receptorów FcγRIIIb na neutrofilach u chorych na SA i

skutkować osłabieniem fagocytozy prątków/Ag/KI i większej immunokomplekssemii. Natomiast w grupie chorych na TB większa liczba genotypu NA1/NA2 oraz rzadsze występowaniem allelu SH, genotypów NA1/SH i NA2/NA2 mogło skutkować większą liczbą funkcjonalnego wariantu receptora FcγRIIIb i intensywniejszą fagocytozą *Mycobacterium tuberculosis*. Wydaje się, że polimorfizm NA1/NA2/SH genu FCGR3B może również znaleźć zastosowanie jako biomarker różnicujący. Ponadto w pracy nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie na podstawie analizy polimorfizmu I232T genu FCGR2B oraz liczby kopii genów FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A, FCGR3B pomiędzy badanymi grupami chorych na sarkoidozę i gruźlicę.

Cele pracy zostały zrealizowane i podsumowane przez Doktoranta w 6 dobrze zredagowanych wnioskach.

Dyskusja wyników zawarta jest w 19 stronicowym omówieniu. Doktorant w sposób dojrzały odnosi własne wyniki do badań innych autorów. Pracę Pana lek. Bartłomieja Rękawieckiego kończy bardzo bogaty spis cytowanego piśmiennictwa 414 pozycji. Jest to nowe, wartościowe, dobrze wybrane piśmiennictwo, pochodzące głównie z ostatnich lat.

Jako Recenzent przed przygotowaniem pracy do druku proponuję wprowadzenie drobnych zmian merytorycznych i redakcyjnych.

Wstęp:

Str. 28

zalecenia Światowej Organizacji Zdrowia rekomendują wykonywanie przesiewowych szybkich testów molekularnych wykrywających materiał genetyczny prątków u osób dorosłych i dzieci z objawami mogącymi świadczyć o gruźlicy. WHO i ECDC zaleca wykonywanie badań molekularnych u wszystkich z podejrzeniem TB nie tylko u chorych z mało specyficznymi objawami.

Str. 29

Wyniki:

Braku opisu większości tabel

Brak podsumowania wyników postawionych w pytaniach, szczególnie zbiorczych podsumowań brakuje przy bardzo rozbudowanych wynikach dotyczących pytania 1-3

Moje bardzo niewielkie uwagi, które Doktorantowi przekazałam osobiście w niczym nie umniejszają wysokiej wartości pracy, którą oceniam bardzo dobrze.

Mam pytanie do Doktoranta: Czy na podstawie uzyskanych wyników można zaproponować algorytm diagnostyczny różnicujący TB i SA?

Proszę Doktoranta o wyjaśnienie co znaczy, że polimorfizmu NA1/NA2/SH genu FCGR3B nie wykazały jego korelacji ze zwiększoną zachorowalnością na sarkoidozę?

Jako Recenzent pracy Pana lekarza Bartłomieja Rękawieckiego chcę podkreślić niezwykle staranność z jaką przygotowana jest ta rozprawa. Na szczególną uwagę zasługuje bogata szata graficzna rycin.

Praca stanowi oryginalny dorobek naukowy Doktoranta i jest dowodem umiejętności planowania i realizowania badań naukowych. Zwracam szczególną uwagę na fakt, że jest to pierwsza kompleksowa analiza polimorfizmu genów kodujących receptory Fcy w grupie chorych na gruźlicę płuc oraz pierwsza analiza porównawcza polimorfizmu tych genów w grupie chorych TB oraz SA. Ponadto chciałabym podkreślić, że Pan lekarz Bartłomiej Rękawiecki jest współautorem publikacji o łącznym współczynniku IF: 8.752, punktach MNiSzW: 140 i h -index=2, jak również trzynastu doniesień zjazdowych. Jest laureatem trzech nagród za prace oryginalne na kongresach zagranicznych i krajowych, co stanowi w przypadku równolegle prowadzonej działalności klinicznej wyróżniający dorobek na tym etapie kariery naukowej.

Chciałbym podkreślić również duży aspekt aplikacyjny wyników uzyskanych przez Doktoranta, które wpisują się w nurt światowych badań dotyczących poszukiwania biomarkerów różnicujących gruźlicę i sarkoidozę. Dwoch jednostek chorobowych o podobnym obrazie klinicznym, radiologicznym i histopatologicznym, co może skutkować błędną diagnozą i błędnym leczeniem. Mam nadzieję, że dalsze badania dotyczące poszukiwania biomarkerów umożliwiających różnicowanie TB i SA prowadzone przez Panią Profesor dr hab. Annę Dubaniewicz okażą się pomocne w diagnozowaniu tych dwóch trudnych diagnostycznie jednostek chorobowych.

Mycobacterium tuberculosis „wielki manipulator” z jego niezwykle zdolności do unikania mechanizmów, które powinny wyeliminować go w makrofagach na początku infekcji ciągle pozostaje dużym wyzwaniem dla naukowców zgłębiających jego mechanizmy przystosowawcze, sposób oddziaływania na organizm gospodarza i chorobotwórczość.

Mając na uwadze bardzo zaawansowany warsztat pracy Doktoranta z zakresu biologii molekularnej, swobodę z jaką posługuje się nowoczesnymi technikami oraz unikalne i oryginalne w skali światowej wyniki badań naukowych stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. Z 2021 r. poz. 478 ze zm.)

Gratulując Doktorantowi i Promotorowi zwracam się do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana lekarza Bartłomieja Rękawieckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną Rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. n. med.
Ewa Augustynowicz-Kopeć

KIEROWNIK
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc