

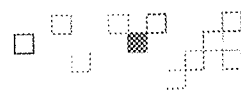
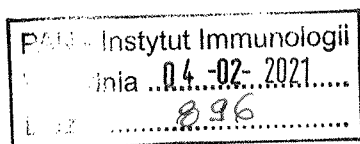
Dr hab. n. biol. Roman Paduch, prof. UMCS
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Katedra Wirusologii i Immunologii

Lublin, dn. 01.02.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Małgorzaty Grudzień**
pt. "Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna nowej psiej linii komórkowej typu NK"
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Rapaka

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Grudzień dotyczy badań nad ustaleniem i charakterystyką nowej psiej linii komórkowej o potencjalnych cechach komórek NK. Ponadto Autorka przeanalizowała rolę wybranych cytokin w regulacji aktywności cytotoksycznej tych komórek. Wszystkie badania przeprowadzone zostały w warunkach *in vitro*.

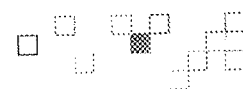
Eksperymenty wykonywane na zwierzętach w istotnym stopniu przyczyniają się do rozwoju nauk biologicznych i medycznych. Zwierzęta używane są głównie do badań anatomicznych, fizjologicznych, farmakologicznych, czy analiz zmian patologicznych i doboru skutecznej terapii. Wybór odpowiedniego gatunku zwierzęcia do badań uzależniony jest od posiadania przez niego konkretnych, swoistych cech dobranych tak by umożliwiły pełną realizację założonych celów doświadczalnych. Obecnie zastosowanie zwierząt w badaniach naukowych pozwala na poznanie i skuteczne eliminowanie wielu chorób samych zwierząt, lecz



również umożliwiają opracowywanie skutecznych terapii dotyczących ludzi. Z tego względu należy poszukiwać i wykorzystywać organizmy modelowe wykazujące jak największe podobieństwo z organizmem ludzkim. Uzyskiwane z ich wykorzystaniem wyniki powinny stanowić doskonały materiał do formułowania wniosków pozwalających na opracowywanie skutecznych farmaceutyków czy terapii dla ludzi. Jednym z takich organizmów modelowych jest pies z uwagi na podobieństwo predyspozycji wystąpienia i przebiegu wielu groźnych chorób w tym nowotworów podobnie jak u człowieka. Wykorzystanie zwierząt w laboratorium podlega jednak obecnie rygorystycznym przepisom prawa dlatego należy szukać alternatywnych metod zastępujących badania na żywym organizmie. Jednym ze sposobów jest uzyskiwanie hodowli tkanek i komórek pochodzących z konkretnych gatunków zwierząt, a wykonywane na nich analizy mogą w dużym stopniu odzwierciedlać rzeczywistość, którą obserwuje się w warunkach *in vivo*. Zakres badań przeprowadzonych w ocenianej rozprawie jak również uzyskane wyniki jednoznacznie wpisują się w trend poszukiwania po pierwsze organizmu modelowego, który właściwościami i reaktywnością komórek byłby bardziej niż dotychczasowe zbliżony do charakterystyki komórek i tkanek człowieka oraz po drugie wyprowadzenia psiej linii komórkowej typu NK umożliwiającej badanie jej immunoreaktywności i aktywności przeciwnowotworowej. Z uwagi na powyższe uważam wybór tematu dysertacji doktorskiej za słuszny i aktualny.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska opracowana została w układzie klasycznym, zgodnym z kanonem przyjętym dla prac doświadczalnych. Jest to 96 stronicowy maszynopis podzielony na 8 rozdziałów. Tekst został uzupełniony o 30 rycin prezentujących wyniki badań oraz schematy obrazujące rolę i aktywność komórek NK. Ponadto praca wzbogacona została o 12 tabel ściśle związanych z tematem badań. Manuskrypt napisany został poprawnym językiem, jednak Autorka nie uniknęła drobnych potknięć edytorskich, które nie mają wpływu na wartość pracy.

Praca uzupełniona została o **wykaz i opis skrótów**, który stanowi ważne uzupełnienie rozpraw z zakresu immunologii, bazujących w dużej mierze na akronimach.



Wstęp rozprawy to zwięźle zaprezentowana podstawa teoretyczna podjętych badań. Autorka przedstawiła model psi jako układ doświadczalny stanowiący wartościowe uzupełnienie do testów prowadzonych na systemach mysich, a pod wieloma względami dopełniającym lub stanowiącym wstępną analizę w badaniach na komórkach ludzkich. Doktorantka scharakteryzowała również budowę oraz aktywność komórek NK w układzie odpornościowym. Dodatkowo, opisana została potencjalna możliwość terapeutycznego wykorzystania psich komórek NK w terapii pacjentów z nowotworami. Rozdział ten, w mojej opinii, w wystarczającym stopniu wprowadza czytelnika w problematykę badawczą podjętą w rozprawie, prezentując podstawy teoretyczne niezbędne do zrozumienia zagadnień poruszanych w dalszej części dysertacji.

Cel pracy przedstawiony został jako uzupełniające się dwa cele główne. Zostały one sformułowane w sposób klarowny. Ciekawym rozwiązaniem jest wykonanie krótkiego opisu poprzedzającego zasadniczy cel badań. Uzasadnia on intencję Autorki potwierdzając konieczność sformułowania tego typu priorytetów eksperymentalnych. Wskazane założenia potwierdzają dobre zorientowanie Doktorantki w zakresie planowanych eksperymentów oraz umiejętność ich racjonalnego opracowania.

Materiały i metody zostały przedstawione bardzo skrupulatnie. Pozwala to na odtworzenie metodyki w innych ośrodkach. Autorka oparła badania o wiele metod eksperymentalnych, m.in. cytometrii przepływowej, reakcji RT-PCR, metod oceny cytotoksyczności, czy analiz immunoenzymatycznych pozwalających na pełne i wiarygodne udowodnienie tez stawianych w celu pracy.

Uzyskane **wyniki** zostały opisane zgodnie z logicznie zaplanowaną kolejnością wykonywania eksperymentów. Są one opisane starannie i jednoznacznie. Uzupełnieniem opisów są wykresy i tabele, których forma graficzna nie budzi zastrzeżeń. Uzyskane wyniki stanowią oryginalne dzieło, wnoszące nowe informacje do wiedzy o aktywności psich komórek NK i potencjalnej możliwości ich praktycznego wykorzystania w terapii ludzkich nowotworów. Ciekawe i wartościowe jest wykonanie zróżnicowanych badań bezpośredniej cytotoksyczności



różnych komórek efektorowych (ludzkich i psich) w stosunku do docelowych komórek nowotworowych oraz prawidłowych komórek śródbłonka. Wykonanie tego typu analiz jednoznacznie potwierdza wykonane opisy części teoretycznej rozprawy. Dobór testów statystycznych oraz wykonana analiza rezultatów nie budzi zastrzeżeń.

Podczas lektury tego rozdziału nasunęły mi się jednak następujące pytania:

- Czy wykonano pomiary morfometryczne wyprowadzonych komórek NK (CNK-89)? Jeśli tak, to jakie były to wyniki. Z uwagi na brak linii skali na Ryc.8 trudno jest określić jednoznacznie rozmiary komórek.
- Cytotoksyczność badano po 4 i 24 godz., zaś wpływ cytokin po 48 godz. Co było powodem przeprowadzenia różnych analiz w różnych wariantach czasowych?
- W badaniach dotyczących cytotoksyczności medium hodowlanego uzyskano ciekawe wyniki. Jednak, czy planowano wykonać oznaczenia cytotoksyczności (bez/z stymulacją interleukiną) w eksperymentach, w których obecne byłyby oba rodzaje komórek (efektorowe i docelowe) jednak przestrzennie oddzielone, np. w modelu typu Transwell? W układzie takim zachowany byłby, przynajmniej po części, zbliżony do naturalnego schemat oddziaływania parakrynnego komórek.

Niemniej jednak na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka zastosowała w pracy wiele interesujących wzajemnych oddziaływań międzykomórkowych oraz pre-aktywacji komórek efektorowych z wykorzystaniem cytokiny w celu pobudzenia ich aktywności i skuteczności działania w stosunku do komórek docelowych.

W **dyskusji** ocenianej dysertacji, Autorka bardzo czytelnie omówiła wyniki badań opierając się na własnej wiedzy oraz danych uzyskanych z literatury światowej. Przeprowadzone rozważania uzasadniają słuszność podjęcia takiego tematu badań. Autorka w bardzo ciekawy sposób wskazuje na możliwą rozbudowę przeprowadzonych doświadczeń i wykonanych obserwacji o inne metody pozwalające na jednoznaczne potwierdzenie uzyskanych wyników. Świadczy to o szerokiej wiedzy Doktorantki i próbach wzbogacenia jak również udoskonalenia własnego modelu badawczego. Bardzo ciekawą obserwacją jest również wskazanie możliwości



podwójnego wykorzystania nowo wyprowadzonej linii typu NK. Doktorantka sugeruje, że mogą one służyć w badaniach jako komórki o aktywności przeciwnowotworowej opartej na ich bezpośredniej cytotoksyczności jak również z uwagi na pochodzenie jako model psiego nowotworu.

Autorka w rozdziale tym opisuje konieczność ochrony komórek śródłonka przed cytotoksyczną aktywnością komórek NK. Zaproponowano wykonanie analiz z fizyczną separacją komórek z wykorzystaniem, jako bariery, membran o określonej porowatości (układy typu Transwell). W warunkach naturalnych komórki NK mogą mieć jednak bezpośredni kontakt ze śródłonkiem. Czy można więc w inny sposób przeprowadzić ochronę śródłonka np. poprzez jego bezpośrednie powierzchniowe zabezpieczenie?

Wnioski z przeprowadzonych badań opracowane zostały w 4 punktach. Odnoszą się one ściśle do uzyskanych wyników. Podsumowują efekty realizowanych eksperymentów, wskazując na ich najważniejsze implikacje. Mam w związku z tym pytanie. Jak Autorka widzi możliwość dalszego rozwoju badań nad opracowaną linią komórkową oraz potencjalne jej zastosowanie w praktyce np. terapii przeciwnowotworowej lub immunoregulacji?

Streszczenie pracy przedstawione zostało w wersji polskiej i angielskiej. W treściwej formie nakreśla ono cele pracy oraz zakres założonych badań. Uważam, że podsumowanie w sposób wystarczający prezentuje niezbędne elementy pracy, klarownie i zwięźle wprowadzając czytelnika w tematykę i zagadnienia badawcze poruszane w rozprawie.

Piśmiennictwo obejmuje 94 pozycje, dobrane prawidłowo. Literatura jest aktualna, i dotyczy zakresu badań podjętych w pracy doktorskiej.

Podsumowując, należy stwierdzić, że Doktorantka w całości zrealizowała zadania, jakie zostały postawione w celu pracy. Wybór metod badawczych i zakres przeprowadzonych eksperymentów umożliwił uzyskanie wyników dających podstawę do opracowania wartościowych wniosków. Podjęta tematyka badawcza jest aktualna, wiążąca ze sobą zagadnienia z różnych dziedzin biologii i medycyny. Na podkreślenie zasługuje również efekt prowadzonych badań w formie wyprowadzonej i wstępnie scharakteryzowanej nowej psiej linii



komórek typu NK. Jest to szczególnie istotne ze względu na konieczność nowoczesnego modelowania *in vitro* i zbliżania tego typu układów do wymagań związanych nie tylko z badaniami na konkretnych gatunkach zwierząt, lecz również z ich ludzkimi odpowiednikami. Pracę oceniam wysoko, mimo uwag które w niczym nie umniejszają jej wartości i mają głównie charakter techniczny.

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Grudzień jest więc opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

W zawiązku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Małgorzaty Grudzień do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę zakres prowadzonych eksperymentów i możliwość ich praktycznego wykorzystania, jak również opublikowanie części badań w recenzowanym czasopiśmie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Grudzień stosowną nagrodą.

Kierownik Katedry

Dr hab. Roman Paduch, prof. UMCS

