



Wrocław, 26.03.2021 r.

Prof. dr hab. Wojciech Nowacki

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Grudzień pt. „ Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna nowej psiej linii komórkowej typu NK ”, wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. Andrzeja Rapaka.

1. Charakterystyka techniczna rozprawy.

Rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Grudzień przedstawiona została na 96. stronach oprawionego wydruku komputerowego. Zawiera 30. rycin i 9. tabel. Na początku dysertacji zamieszczono po stronie tytułowej podziękowania oraz informację o źródle finansowania. Praca była współfinansowana w ramach dwóch projektów: 1. Projekt badawczy NCN nr 2011/03/B/NZ5/01533 pt.: „Skojarzona indukcja śmierci komórek psich białaczek i chłoniaków”. Wykonawca: Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Kierownik projektu: dr hab. Andrzej Rapak. 2. Projekt grantowy NCBiR/NCN *TANGO2 nr Tango2/340428/NCBR/2017* pt.: „Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w diagnostyce i celowanej terapii, przeciwnowotworowej psich białaczek i chłoniaków”. Projekt realizowany w ramach konsorcjum przez Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN (lider), VetPlanet Łomianki. Kierownik grantu: dr hab. Andrzej Rapak. Opracowania związane z niniejszą rozprawą zostały przedstawione na str. 4. Spis treści znajdujemy na str. 5-6., potem streszczenie w języku polskim str.7. a streszczenie w języku angielskim na str.8. Wykaz stosowanych skrótów znajdujemy na str. 9-11. Zasadnicze opracowanie składa się z 13. stron wstępu, 1. strony na której przedstawiono cel pracy, materiał i metody zajmują str. 27-42., wyniki badań to kolejne 31. stron, dyskusja wyników 10. stron, wnioski 1. strona. Na str. 85-94. Autorka podaje 94 pozycje dobrze dobrane, aktualnego, anglojęzycznego



piśmiennictwa. Następnie na str. 95-96 znajdujemy wykaz rycin i tabel. Układ opracowania jest klasyczny. Cała dysertacja jest starannie przygotowana .

2. Charakterystyka merytoryczna opracowania, realizacji celu i uzyskanych wyników .

Pies jest nie tylko częstym i najbliższym towarzyszem człowieka wśród gatunków z nim współbytujących. W pewnych sytuacjach, jak podkreśla to Autorka rozprawy, staje się doskonałym zwierzęciem modelowym. Dotyczy to szczególnie indukowania i rozwoju chorób nowotworowych.

Zainteresowanie Doktorantki ogniskuje się na limfocytach NK. Takiej linii komórkowej do tej pory nie scharakteryzowano u psów. Komórki NK mimo, że wywodzą się z szeregu limfocytarnego, głównie z racji swojej szybkiej interakcji z komórkami nowotworowymi i zainfekowanymi wirusami, zaliczamy do komórkowych elementów odporności wrodzonej. Celem dysertacji było scharakteryzowanie fenotypowe oraz funkcjonalne nowej linii komórkowej CNK-89, wywodzącej się z psiego nowotworu, wykazującej we wstępnych badaniach cechy komórek NK. Cel ten został zrealizowany dzięki zaangażowaniu Doktorantki oraz owocnej współpracy grupy naukowców.

Drugi zrealizowany cel, to ocena wpływu wybranych cytokin (IL-2,IL-12,IL-15,IL-18 oraz IL-21) na aktywność cytotoksyczną komórek nowej psiej linii – CNK-89.

We wstępie pracy znajdujemy aktualną informację na temat receptorów występujących na komórkach NK człowieka. Autorka porządkuje je w czterech grupach jako receptory aktywujące, aktywująco/inhibitorowe, inhibitorowe oraz cytokinowe. Na tym tle zostaje przedstawiona aktualna wiedza na temat limfocytów NK psa.

Krótko przedstawiony jest mechanizm enzymatycznego (perforyny, granzymy) i receptorowego niszczenia komórki docelowej oraz udział komórek NK w reakcji cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC).

Przedstawione zostaje zestawienie tabelaryczne linii komórek docelowych używanych w badaniach aktywności bójczej psich komórek NK, które w dotychczasowych badaniach pochodziły z materiału pierwotnego izolowanego z krwi obwodowej lub szpiku kostnego.

W dalszej części omówiony zostaje wpływ wybranych interleukin na aktywność cytotoksyczną, produkcję cytokin, proliferację oraz przeżywalność limfocytów NK.



Wstęp kończy przedstawienie podejścia terapeutycznego wykorzystującego komórki NK oraz perspektywy immunoterapii u psów na tle obecnych możliwości terapeutycznych u ludzi.

W rozdziale materiały i metody przedstawiono użyte w eksperymentach ludzkie i psie linie komórek docelowych. Przedstawiono stosowane w badaniach rekombinowane psie IL-2, IL-12 i IL-21 oraz ludzkie IL-15 i IL-18. Tabelarycznie przedstawiono listę przeciwciał użytych do określenia fenotypu komórek CNK-89. W ten sam sposób podano sekwencje starterów użytych do amplifikacji genów zawartych w psim cDNA.

Główne metody stosowane w tym opracowaniu to: fenotypizacja cytometryczna komórek, izolacja RNA i technika RT-PCR, badanie bezpośrednio cytotoksyczności, mikroskopia optyczna oraz test ELISA.

Metody te zostały opisane w zakresie wystarczającym dla danej procedury. Wybór analizy statystycznej nie budzi zastrzeżeń.

Dokumentacja uzyskanych wyników została dobrze i kompletnie przedstawiona.

Cztery wnioski wynikają z przeprowadzonych doświadczeń.

Dyskusja świadczy o znajomości tematu. Jest logicznie poprowadzona z wykorzystaniem własnych wyników w odniesieniu do danych piśmiennictwa.

Podzielam pogląd Pani mgr Małgorzaty Grudzień, że opracowanie i charakterystyka komórek CNK-89 ma potencjalne znaczenie w opracowywaniu immunoterapii u psów, a to może przełożyć się na amplifikację terapii nowotworów u ludzi.

3. Uwagi krytyczne i sugestie.

Nie udało się uniknąć pewnych usterek redakcyjnych. Np. na str. 10. W wykazie skrótów NKp30 znajdujemy rozwinięcie: białko spokrewnione z p46 komórek NK a przy NKp46 białko spokrewnione z p30 komórek NK.

Str. 29. „Komórki nieadherentne hodowano następnie przez 6 miesięcy i kilkakrotnie oceniano ich fenotyp poprzez cytometrię przepływową.” (raczej: stosując lub metodą cytometrii przepływowej)

Str. 30 „...przygotowano preparaty komórek zateżonych przy pomocy wirówki typu cytospin. „

Komórki raczej zagęszczamy lub zwiększamy ich koncentracje.

Str. 33. „ Na kolumnienkę nanoszono 50 µl wody...” Jakiej?!

Nie wszystkie skróty zostały ujęte w wykazie (np. EtOH str. 33)



Podane na str. 29. informacje odbieram jako mało precyzyjne, mimo świadomości, że ustanawianie psiej linii komórkowej było realizowane przez inne osoby.

Str. 48. „ Historycznie często używaną meto do tego celu był pomiar wydzielania radioaktywnego chromu (^{51}Cr) przez umierające komórki docelowe, ...”

Po pierwsze metoda z radioaktywnym chromem jest metodą najczulszą i nadal stosowaną - prace z 2021 r. , nie jest więc to metoda historyczna jak podaje Autorka. Po drugie komórka docelowa obumierając chrom uwalnia a nie wydziela.

Kontrowersyjne stylistycznie i merytorycznie jest zdanie na str.77. : „ Badania dotyczące cytotoxyczności bezpośredniej przeprowadzone były przy użyciu cytometrii przepływowej, opracowując metodę barwienia komórek docelowych przy użyciu nietoksycznego i nieradioaktywnego barwnika fluorescencyjnego .”

Przedstawione przykłady to niedopracowania, które należy wyeliminować.

4. *Podsumowanie.*

Stwierdzam, że praca doktorska pt. „ Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna nowej psiej linii komórkowej typu NK” opracowana przez Panią mgr Małgorzatę Grudzień, spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, a określone w art. 13 ust.1 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 późniejszymi zmianami). Przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek o przeprowadzenie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pracę uważam za godną nagrodzenia, ze względu na uzyskanie, we współpracy naukowej, pierwszej o cechach komórek NK psiej linii komórkowej - CNK-89 i jej scharakteryzowanie, z wykorzystaniem dostępnych nowoczesnych technik. W moim odczuciu jest to osiągnięcie naukowe o potencjale aplikacyjnym.

Prof. dr hab. Wojciech Nowacki