

Warszawa, 2020-05-15

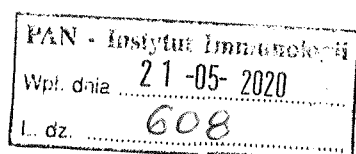
Recenzja poprawionej wersji rozprawy doktorskiej mgr Marty Lisowskiej pt.:
„Wytworzenie i charakterystyka nowych przeciwciał monoklonalnych swoistych
wobec antygenów zgodności tkankowej DR psa (DLA-DR) jako narzędzi w
diagnostyce i eksperymentalnej terapii chłoniaków”

Po zapoznaniu się z poprawionym tekstem rozprawy oraz z opinią promotora, dołączoną do dokumentacji, oświadczam, że forma ocenianej rozprawy została znacznie poprawiona. Praca jednak ciągle zawiera szereg błędów edytorskich, z których część wymienię w dalszej części recenzji.

Nie zmieniałam wyrażonego poprzednio zdania odnośnie **wysokiej wartości merytorycznej wyników uzyskanych przez panią mgr Lisowską i opisanych w tej rozprawie doktorskiej**. W związku z tym, poniżej powtarzam obszernie fragmenty, dotyczące tego aspektu doktoratu, z mojej wcześniejszej recenzji. Ocena wykonanej pracy eksperymentalnej pozostaje bez zmian i jest jednoznacznie pozytywna. Moje poprzednie uwagi krytyczne dotyczyły jedynie nieakceptowalnej formy rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr Marty Lisowskiej wykonana została w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem prof. dr hab. Arkadiusza Miążka. W wyniku realizacji ocenianej rozprawy doktorskiej powstały dwie publikacje, z których pierwszą opublikowano w 2018 r. w Hematological Oncology (IF: 3.439) a drugą w 2019 r. w Cancers (Basel) (IF: 6.162). Ponadto, wyniki prezentowane były na 5 konferencjach międzynarodowych i 3 krajowych. Badania były realizowane w ramach dwóch projektów, projektu TANGO, którego kierownikiem był prof. dr hab. Andrzej Rapak oraz projektu PRELIDIUM, w którym kierownikiem była pani mgr Marta Lisowska.

Oceniana praca zawiera wszystkie typowe i niezbędne części rozprawy doktorskiej.: Streszczenie polskie i angielskie, Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki,



Dyskusja, Wnioski, Literatura oraz Spis tabel i rysunków. Praca ma formę 95-stronicowego maszynopisu zawierającego 6 tabel, 33 rysunki i 83 pozycje literatury.

Praca ma charakter biotechnologiczny a jej celem było uzyskanie monoklonalnych mysich przeciwciał rozpoznających specyficznie antygeny obecne na powierzchni psich chłoniaków B-komórkowych, ocena przydatności uzyskanych przeciwciał w diagnostyce psich chłoniaków oraz poprawa tej potencjalnej przydatności poprzez modyfikacje polegające na kaninizacji oraz koniugacji z metotreksatem. Cele te zostały osiągnięte. Pani Marta Lisowska uzyskała dwa klony hybrydomy (B5 i E11), które były reaktywne wobec antygenów powierzchniowych psich chłoniaków B-komórkowych. Reaktywność uzyskanych przeciwciał potwierdzono z użyciem odpowiednich psich linii komórkowych oraz w materiale biologicznym pobranym od psów. Następnym krokiem była identyfikacja epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała B5 i E11 oraz określenie ich reaktywności. Okazało się, że oba przeciwciała specyficznie rozpoznają epitopy konformacyjne na cząsteczce psiego białka zgodności tkankowej (DLA-DR) oraz że epitop rozpoznawany przez B5 jest w obrębie łańcucha DR α , natomiast wiązanie E11 wymaga obecności obu łańcuchów DLA-DR. W następnych etapach pracy wykonano testy cytotoksyczności polegające na analizie spadku liczby żywych komórek chłoniaka (linie CLBL1 i CLB70) potraktowanych przeciwciałami oraz sprawdzenie czy obserwowana cytotoksyczność wynika z faktu indukowania apoptozy i przebiega z udziałem kaspaz. Większość powyższych eksperymentów przeprowadzono tylko z przeciwciałami B5 lub koniugatem B5 z metotreksatem (B5-MTX). Następnie wykazano, że cytotoksyczny efekt B5 i E11 jest zależny od dopełniacza oraz że przeciwciała te stymulują fagocytozę komórek psich chłoniaków. Następnie wykazano przydatność przeciwciał B5 i E11 do diagnostyki psich chłoniaków, szczególnie poprzez ich wykorzystanie do testu kanapkowego ELISA (ang. sandwich ELISA). W dalszych etapach pracy doktorantka skoncentrowała się na przeciwciałach B5. Uzyskała przeciwciała zawierające fuzję części zmiennej przeciwciała B5 z regionem stałym psiej immunoglobuliny w komórkach linii CHO oraz wykazała reaktywność supernatantu z tych komórek wobec komórek dwóch linii chłoniaka psów. Dodatkowa strategia poprawienia funkcjonalności przeciwciał B5 polegała na uzyskaniu koniugatu z metotreksatem (MTX), co poprawiło cytotoksyczność względem komórek chłoniaka bez zmiany ogólnego mechanizmu tej cytotoksyczności.

W końcowych rozdziałach opisane są wyniki badania terapeutycznego podania przeciwciał B5 i B5-MTX z użyciem mysiego modelu choroby. Pozytywny efekt przeciwciał wykazano na kilka sposobów: stwierdzono wydłużenie czasu przeżywalności, zaobserwowano zanik lub zmniejszenie ognisk wzrostu nowotworu, wykazano brak ubytku wagi, brak komórek nowotworowych w szpiku oraz w innych organach a także znaczną redukcję poziomu białka DLA-DR w surowicy.

Recenzowana rozprawa doktorska bazuje na logicznym ciągu doświadczeń, prowadzącym od stworzenia koncepcji (immunizacja myszy komórkami chłoniaka psów) do uzyskania narzędzi diagnostycznych i terapeutycznych przeznaczonych do badania i leczenia psów. Jest to solidna praca badawcza, stanowiąca podstawę ewentualnych prac wdrożeniowych, które oczywiście nie są przedmiotem rozprawy i które przekraczałyby ramy typowego doktoratu.

Trochę szkoda, że doktorantka nie przyłożyła się jednak nieco bardziej do przygotowania wersji poprawionej. Wstęp pozostał bardzo lakoniczny i raczej w niewielkim stopniu został poprawiony, ponieważ znajdujące się w tej części Rysunki 2 i 3 w dalszym ciągu nie są cytowane w tekście rozprawy. Podobny zarzut dotyczy także części tabel, np. Tabela 2, Tabela 3 w Materiałach i metodach, które powinny zostać wymienione w tej części tekstu, w której się pojawiają. We wstępie ciągle jest sporo drobnych błędów edytorskich. Do tego typu błędów zaliczam także błąd znajdujący się w Materiałach i metodach na stronach 47-48 rozprawy, gdzie autorka odwołuje się niepoprawnie do Rysunku 23 i Tabeli 5. Ta część (3.2.12. Kaninizacja) zawiera zresztą powtórzenie i nie została należycie przejrzana i poprawiona. Z kolei w rozdziale 4.4. Wyników (rozdział dotyczący otrzymania i wstępnej charakterystyki kaninizowanego przeciwciała) doktorantka nie pokazuje dokumentacji dotyczącej tego etapu badań. Proszę o ewentualne uzupełnienie tego niedociągnięcia w prezentacji w trakcie obrony.

Ciągle w różnych częściach tekstu dostrzegam trochę kolokwializmów i niezręcznych sformułowań, co jest szczególnie zadziwiające biorąc pod uwagę fakt, że autorka dostała szansę powtórnego przejrzania i czas na poprawienie pracy.

Błędy te, aczkolwiek dość mocno utrudniające lekturę, nie umniejszają wartości merytorycznej pracy i oczywistego zaangażowania się pani mgr Marty Lisowskiej w dobrze zaplanowane badania naukowe, zakończone wg. mojej oceny bardzo pozytywnym wynikiem. W związku z biotechnologicznym charakterem pracy, chciałabym dowiedzieć się, jakie jest zdanie doktorantki na temat realnych możliwości wykorzystania uzyskanych przeciwciał do diagnostyki i

terapii nowotworów psów. Kolejnym nasuwającym się pytaniem do dyskusji w trakcie publicznej obrony doktoratu jest czy po immunizacji myszy psią linią chłoniaka uzyskano przeciwciała o innej reaktywności tj. rozpoznające inne antygeny powierzchniowe komórek rakowych niż antygen DLA-DR, rozpoznawany przez B5 i E11. Jeśli tak, to jakie to były przeciwciała i dlaczego wybrano właśnie B5 i E11 do dalszych analiz. Jeśli nie, to co było powodem tego wyniku.

W podsumowaniu recenzji zaznaczam, że poprawiona rozprawa doktorska pani mgr Marty Lisowskiej spełnia warunki ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym **zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk z wnioskiem o dopuszczenie pani Marty Lisowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Prof. dr hab. Agnieszka Sirko