

Prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński
KATEDRA I ZAKŁAD IMMUNOLOGII KLINICZNEJ
UNIwersytet Medyczny w Lublinie

ul. Chodźki 4a
20-093 Lublin

Tel. (0-81) 448 64 20
fax (0-81) 448 64 21
e-mail: jacek.rolinski@gmail.com

Lublin dn. 15.06.2017r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Moniki Grygorowicz pt. „Wpływ lenalidomidu na interakcje regulatorowych limfocytów T z komórkami chłoniaków komórek B” wykonanej w Zakładzie Immunologii Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie pod kierunkiem dr hab. n. med. Sergiusza Markowicza, prof. nadzw.

Komórki T regulatorowe (Treg), w warunkach fizjologicznych pełnią wiele ważnych funkcji nadzorujących działanie układu odpornościowego. Treg wykazują działanie supresorowe w stosunku do innych komórek immunokompetentnych oraz biorą udział w indukcji tolerancji wobec autoantygenów, zabezpieczając w ten sposób organizm przed rozwojem autoagresji. Hamują aktywację, proliferację i różnicowanie, m.in. limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺, limfocytów B, monocytów, komórek NK, NKT oraz komórek dendrytycznych. Działanie to wywierają w różny sposób np. poprzez bezpośredni kontakt z uczulonymi przez antygen limfocytami T i B lub poprzez wytwarzanie cytokin o działaniu immunosupresyjnym, takich jak IL-10 czy TGFβ. Prowadzi to do zahamowania proliferacji swoistych wobec danego antygeny limfocytów T lub B. Wraz z rozwojem metod badawczych wyróżniono kilka subpopulacji komórek Treg, zarówno wśród limfocytów CD8⁺ jak i CD4⁺, spośród, których najlepiej poznane są limfocyty nTreg i iTreg. Można je odróżnić między innymi na podstawie ekspresji czynnika transkrypcyjnego Helios, charakterystycznego dla nTreg. Populacja limfocytów iTreg odpowiada za zjawisko tolerancji w miejscu toczącego się

procesu zapalnego, hamując nadmierną, mogącą prowadzić do uszkodzenia tkanek, odpowiedź immunologiczną. Komórki iTreg zasiedlają głównie tkankę limfatyczną związaną z błonami śluzowymi jelit oraz dróg oddechowych, gdzie ma miejsce stała ekspozycja na obce antygeny, głównie bakteryjne i wirusowe. W przewlekłych infekcjach limfocyty Treg odgrywają niekorzystną rolę, przyczyniając się do rozwoju tolerancji na obce antygeny drobnoustrojów. Podobnie jest w przypadku nowotworów, kiedy komórki Treg indukują tolerancję na antygeny guza. Zwiększenie odsetka i liczby komórek Treg obserwowano u chorych na wiele nowotworów, zarówno we krwi obwodowej jak i w obrębie guza. W większości nowotworów wykazano, iż obecność komórek Treg wśród leukocytów naciekających guz jest złym czynnikiem rokowniczym, korelującym z krótszym czasem przeżycia, występowaniem przerzutów, wyższym stopniem zaawansowania nowotworu. W przypadku niektórych chłoniaków B komórkowych i klasycznej postaci choroby Hodgkina wykazano korzystne działanie limfocytów Treg. Hamują one aktywację i proliferację nowotworowych limfocytów B. Komórki Treg próbuje się wykorzystać w leczeniu różnych chorób. U chorych po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych lub z początkową fazą rozwoju cukrzycy, podanie komórek Treg związane było odpowiednio ze zmniejszeniem stopnia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi lub zahamowaniem niszczenia trzustki. W przypadku immunoterapii guzów litych z wykorzystaniem komórek dendrytycznych zmniejszenie liczby limfocytów Treg poprawiało wyniki leczenia. W przypadku leków immunomodulujących ich wpływ na komórki Treg częściowo poznano „in vitro”, o wiele mniej danych istnieje w przypadku chorych na nowotwory leczonych tymi lekami. Dokładne poznanie wpływu lenalidomidu, (który jest wykorzystywany w leczeniu nowotworów B komórkowych) na limfocyty Treg ma bardzo istotne znaczenie praktyczne, co w pełni uzasadnia podjęcie badań stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej. Temat pracy

jest niezwykle ważny i aktualny biorąc pod uwagę niewielką liczbę publikacji dotyczących tego zagadnienia.

Celem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej, była ocena zdolności allogenicznych komórek Treg do hamowania wzrostu linii komórkowych wywodzących się z chłoniaków B komórkowych w obecności i bez obecności lenalidomidu. Oceniana rozprawa ma układ typowy dla prac eksperymentalnych i liczy 140 stron maszynopisu. Składa się z następujących części: streszczenie polskie i angielskie, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, oraz piśmiennictwo. Na początku pracy umieszczono spis treści i wykaz stosowanych skrótów.

Dokładną znajomość podjętego tematu badań potwierdza zawarty na 20 stronach Wstęp, w którym doktorantka w sposób wyczerpujący, czytelny oraz dobrze zilustrowany rycinami, scharakteryzowała lenalidomid i jego wpływ na układ odpornościowy oraz komórki nowotworowe. Następnie przedstawiła komórki Treg, kolejno opisując ich właściwości, poszczególne subpopulacje i kluczowe cytokiny odgrywające istotną rolę w ich różnicowaniu. W kolejnej części wstępu omówiła funkcje limfocytów Treg w różnych stanach chorobowych oraz mechanizmy indukowania przez nie immunosupresji. Na zakończenie Wstępu znalazł się opis dotyczący roli limfocytów Treg w nowotworach układu chłonnego.

Założenia i cel pracy przedstawione zostały w sposób jasny i logiczny. Badania przeprowadzone były w warunkach *in vitro*, na ustalonych liniach komórkowych i komórkach jednojądrzastych uzyskanych od zdrowych dawców krwi (szkoda że Doktorantka nie zaznaczyła od ilu zdrowych dawców pochodził materiał). W badaniach wykorzystano techniki hodowli komórkowych oraz cytometrii przepływową oceniając poszczególne komórki przy pomocy przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami. Doktorantka wykorzystwała też metody biologii molekularnej, w celu oceny statusu metylacji DNA regionu TSDR genu FOXP3. Praca imponuje liczbą wykonanych doświadczeń

zwłaszcza, że badania przeprowadzono z wykorzystaniem pracochłonnych metod hodowli komórkowych wykorzystanych między innymi do generacji komórek dendrytycznych z monocytów krwi obwodowej i namnażania limfocytów Treg w obecności IL-2 + rapamycyna oraz sortowania komórek z wykorzystaniem sortera FACS Aria. Sposób prezentacji części metodycznej pracy świadczy o samodzielnym wykonaniu badań i dobrej znajomości technik wykorzystywanych w immunologii oraz biologii molekularnej. Elementem wzbogacającym pracę są przykładowe ryciny z analiz cytometrycznych czy zdjęcia z mikroskopu świetlnego dokumentujące przeprowadzone badania. Wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej przy pomocy programu SPSS 14.0 przedstawione w postaci 39 rycin lub zdjęć.

Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej przyniosły szereg ważnych obserwacji. Doktorantka zaobserwowała wyraźną tendencję do namnażania i wzrostu odsetka limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+CD127^{lo} i ^{hi} w miarę wydłużania czasu hodowli. Różnice pomiędzy 3 tygodniami a 5 tygodniami namnażania była 10-krotna. Podobnie było z ekspresją markera CD39, odsetek Treg CD39⁺ zwiększał się w czasie wydłużania hodowli, przy zachowaniu względnej liczebności tych komórek, w przeciwieństwie do limfocytów Treg CD62L⁺ których odsetek zmniejszał się. Najbardziej interesujące wg recenzenta są wyniki dotyczące oceny proliferacji komórek różnych linii chłoniaków pod wpływem limfocytów Treg. Autorka wykazała że namnożone poliklonalnie w obecności rapamycyny i niskich dawek IL-2, limfocyty Treg hamowały proliferację 11 spośród 12 ustalonych linii chłoniaków (z wyjątkiem linii chłoniaka z komórek płaszczka REC-1), podobne zjawisko Doktorantka obserwowała w przypadku świeżo wyodrębnionych limfocytów Treg, które w większości hamowały proliferację komórek chłoniakowych. Regulacyjny wpływ Treg na komórki chłoniakowe odbywał się zarówno poprzez bezpośredni kontakt jak i poprzez czynniki rozpuszczalne. Jednak stwierdzono również możliwość wspomaganie ich proliferacji. Dodatek lenalidomidu do hodowli wzmacniał hamowanie proliferacji niektórych

linii np. U-266, MINO, U-2940, L-1236, i DOHH-2 oraz linii Ramos, w przypadku innych linii Doktorantka nie obserwowała tego zjawiska. Przeprowadzone badania stwarzają nowe możliwości terapeutycznego wykorzystania komórek Treg, wymaga to jednak dalszych badań.

Wyniki badań i przeprowadzona nad nimi dyskusja wskazują na dojrzałość Autorki w prowadzeniu analizy naukowej oraz na posiadanie umiejętności korzystania z czasopism naukowych. Ważnym, nowatorskim aspektem badań było wykorzystanie w doświadczeniach z lenalidomidem, izolowanych i namnożonych „in vitro” allogenicznych limfocytów Treg oraz komórek dendrytycznych generowanych z monocytów krwi obwodowej.

Wyciągnięte wnioski wypływają z uzyskanych wyników badań, Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury dotyczącej przedmiotu, cytowane piśmiennictwo w znacznej części obcojęzyczne, pochodzi z ostatnich lat. Uwagi krytyczne dotyczą strony technicznej przedstawionej rozprawy i nie umniejszają jej wysokich walorów naukowych. Ponad 18 stron ze 140 stronicowej pracy to piśmiennictwo, szkoda że nie zostało ponumerowane co ułatwiłoby orientację co do liczby cytowanych pozycji. Doktorantka niepotrzebnie wprowadza nowe skróty np. PCM - szpiczak plazmocytowy zamiast stosować powszechnie przyjęty zarówno w piśmiennictwie polskim jak i angielskim skrót MM (od angielskiej Multiple Myeloma).

Reasumując uważam, że temat rozprawy jest nowatorski, a praca jest dobrze merytorycznie opracowana i stanowi oryginalne rozwiązanie przez Doktorantkę zagadnienia naukowego. Doktorantka w pełni zrealizowała założenia i cele pracy, metody badawcze zostały dobrze zaplanowane i szczegółowo opisane a dyskusja została rzetelnie przedstawiona. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Moniki Grygorowicz spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy 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 późn. zm.) i stanowi wartościowy, oryginalny dorobek naukowy. Mam więc zaszczyt i przyjemność przedłożyć Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im M. Skłodowskiej-Curie wniosek o dopuszczenie mgr Moniki Grygorowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie pracy odpowiednio do jej wartości nagrodą naukową.

Łączę wyrazy szacunku



Prof. dr hab. med. Jacek Roliński