

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. 16.07.2020r.

Ocena

rozprawy doktorskiej magister Marzeny Biernackiej zatytułowanej: „Oddziaływania regulatorowych limfocytów T na komórki chłoniaków z komórek B” wykonanej w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowy Instytutu Badawczy w Warszawie

Promotor pracy: dr. hab. n. med. Sergiusz Markowicz, prof.

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest ocena wpływu allogenicznych regulatorowych limfocytów T (Treg) na proliferację komórek nowotworowych wybranych linii chłoniaków w warunkach in vitro. Rozrosty wywodzące się z linii limfocytów B stanowią heterogenną grupę nowotworów o odmiennym rokowaniu w zależności od wielu różnych czynników, do których należy między innymi prawidłowo funkcjonujący układ odpornościowy chorego. Zaburzenia jakościowe i ilościowe komórek układu odpornościowego obecnych zarówno w mikrośrodowisku nowotworu jak i w narządach limfatycznych oraz krążących w organizmie chorego mają istotny wpływ na przebieg choroby nowotworowej. Wśród wielu subpopulacji limfocytów istotną rolę pełnią limfocyty Treg. Ocena wpływu tej subpopulacji komórek na nowotworowe limfocyty B stanowi wiodący temat rozprawy doktorskiej. Pracę oceniam jako ciekawą i nowatorską, wpisującą się w najnowsze trendy badań nad poszukiwaniem molekuł i komórek układu odpornościowego, które potencjalnie mogą zostać wykorzystane w immunoterapii zwłaszcza nowotworów. Wpływ komórek Treg na nowotworowe limfocyty B, został omówiony w wielu publikacjach naukowych, ale wyniki

tych badań są kontrowersyjne i nie przedstawiają jednoznacznej odpowiedzi na temat znaczenia obecności komórek Treg w mikrośrodkowisku poszczególnych guzów nowotworowych. Dlatego też podjęcie tego tematu badań wydaje się interesujące nie tylko z onkologicznego punktu widzenia, ale również z powodu możliwości praktycznego wykorzystania wyników prezentowanych badań. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska poszerza naszą wiedzę na temat biologii chłoniaków oraz wpływu i mechanizmów działania Treg na nowotworowe limfocyty B.

Praca doktorska mgr Marzeny Biernackiej liczy 97 strony tekstu, zawiera 33 ryciny, 2 tabele i ma układ treści typowy dla prac eksperymentalnych. Rozprawa obejmuje, klasyczne dla tego typu prac części: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo liczące 120 pozycji, obejmujące publikacje zarówno starsze, jak i te najnowsze z 2019 roku. Praca napisana jest poprawnie językowo, czytelną polszczyzną i zawiera jedynie nieliczne potknięcia stylistyczne i gramatyczne, które w żadnej mierze nie umniejszają jej walorów merytorycznych.

W krótkim liczącym 6 stron wstępie Doktorantka dokonała przeglądu piśmiennictwa dotyczącego poruszanej problematyki. Zwięźle opisała badane komórki: historię ich odkrycia, pochodzenie i różnicowanie, różne subpopulacje oraz funkcje i aktywności biologiczną poszczególnych populacji limfocytów Treg. Następnie Autorka zaprezentowała zaburzenia kliniczne związane z dysfunkcją komórek Treg, najczęściej spowodowane mutacjami w genie FOXP3. Omówiła również rolę komórek Treg w guzach litych i wybranych nowotworach limfoproliferacyjnych ze szczególnym uwzględnieniem, rozlanego chłoniaka z dużych limfocytów B (DLBCL), chłoniaka Hodgkina, przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL) i szpiczaka plazmocytozowego (MM). Autorka w sposób zwięzły opisała również aktualne poglądy dotyczące wykorzystania limfocytów Treg w transplantologii i leczeniu chorób

autoimmunologicznych. W ocenie recenzenta wstęp jest napisany w sposób bardzo zwięzły i czytelny.

Założenia pracy zostały przedstawione jasno i precyzyjnie w postaci krótkiego opisu, natomiast cele badań w 3 punktach, z których drugi: „Ocena zdolności namnożonych CD4+CD25+Treg do regulacji proliferacji ustalonych linii chłoniaków wywodzących się z obwodowych limfocytów B i regulacji proliferacji aktywowanych konwencjonalnych limfocytów T” wydaje się najbardziej istotny z klinicznego punktu widzenia. Za cel badań Doktorantka postawiła sobie również ocenę „czy działanie regulacyjne Treg wobec chłoniaków z obwodowych limfocytów B odbywa się w kontakcie bezpośrednim, czy poprzez wydzielane cytokiny”.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka przedstawiła sposób pozyskiwania badanych subpopulacji komórek z koncentratów leukocytno-płytkowych krwi obwodowej zdrowych dawców. Krew obwodową wykorzystaną do analiz otrzymała z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie. Schemat izolacji limfocytów, generacji komórek dendrytycznych z monocytów (MoDC) oraz namnażanie subpopulacji limfocytów T bez i w obecności rapamycyny udokumentowała w postaci graficznej na rycinach 1-3. W badaniach wykorzystwała też nowotworowe linie komórkowe wywodzące się z limfocytów B: DOHH-2, Ramos, MINO, U-2940, L-1236, L-428, KM-H2, U-266 oraz RPMI-8226, które zbiorczo przedstawiła w tabeli 1. W dalszej części opisała metody przygotowania komórek do hodowli, sposób ich rozmrażania, bankowania, znakowania barwnikami CFSE i CMTMR, procedurę oceny funkcji regulacyjnych limfocytów, a także sposób znakowania komórek z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych przed analizą w cytometrze przepływowym FACS Canto II. Wykaz stosowanych przeciwciał monoklonalnych przedstawiono w Tabeli 2. W tej części rozprawy Doktorantka opisała również doświadczenia z użyciem mieszanych hodowli komórek efektorowych z komórkami chłoniaków lub NAC w

warunkach „in vitro”, między innymi z wykorzystaniem komór przedzielonych błoną półprzepuszczalną. Na uwagę zasługuje dokładny opis oceny poziomu metylacji DNA regionu regulatorowego TSDR genu FOXP3. Sposób zaplanowania i przeprowadzenia doświadczeń świadczy o dobrym warsztacie badawczym Doktorantki.

Rozdział dotyczący wyników badań przedstawiono szczegółowo i udokumentowano 29 rycinami. Na początku Doktorantka dokonała oceny składu odsetkowego poszczególnych frakcji wyseparowanych magnetycznie limfocytów zarówno w całej populacji NAC jak i frakcji komórek CD25- i CD25+. Wykonane badania wykazały istotne różnice pomiędzy średnim poziomem demetylacji DNA regionu TSDR genu FOXP3 w całej wyodrębnianej populacji NAC a frakcją komórek CD25+ oraz pomiędzy frakcjami komórek CD25- i CD25+. Ważnym odkryciem było wykazanie większej zdolności allogenicznych komórek CD25+ namnażanych w obecności rapamycyny do hamowania proliferacji komórek chłoniaka niż namnażanych bez obecności rapamycyny. Limfocyty frakcji CD25+ hamowały proliferację komórek chłoniaka (komórki linii Namalwa i DOHH-2) w obecności rapamycyny zarówno w niskim stężeniu 10 ng/ml jak i wysokim 100 ng/ml. Doktorantka stwierdziła również, że limfocyty Treg CD25+ namnożone przez okres 2 lub 3 tygodni w obecności allogenicznych MoDC i rapamycyny hamowały proliferację komórek chłoniaka linii DOHH-2, Namalwa i Ramos. Podobne istotne zmiany wykazała w przypadku allogenicznych limfocytów Treg (frakcja CD25+) namnożonych poliklonalnie w obecności rapamycyny. Badania wykazały regulacyjną funkcję komórek Treg wobec wybranych linii chłoniaków zarówno poprzez bezpośredni kontakt analizowanych komórek jak i bez tego kontaktu przy udziale czynników rozpuszczalnych.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań są ważną informacją na temat funkcji limfocytów Treg wobec wybranych linii komórek chłoniakowych. Omówienie wyników jest szczegółowe, należy podkreślić umiejętne i krytyczne przedstawienie otrzymanych wyników w porównaniu do innych publikacji z tego zakresu. Założone cele badań zostały w pełni

zrealizowane, a cztery. wnioski mające źródło w przeprowadzonych doświadczeniach stanowią wyczerpujące podsumowanie zagadnień zawartych w celach pracy. Ostatni czwarty wniosek jest cenną sugestią dotyczącą możliwości praktycznego wykorzystania limfocytów Treg w celu zahamowania proliferacji komórek chłoniaka po auto- lub alloHSCT. Doktorantka sądzi że w przypadku alloHSCT terapia adoptywna komórkami Treg mogłaby zapobiegać lub ograniczać reakcję GvHD działając jednocześnie przeciwko komórkom nowotworowym przy pomocy limfocytów T efektorowych. Podjęty temat stwarza solidną podstawę do kolejnych badań na tym polu. Cała rozprawa przygotowana jest czytelnie i przejrzysto. Przedstawiony problem badawczy oraz uzyskane wyniki zaprezentowane są w logiczny sposób.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska magister Marzeny Biernackiej zatytułowana: „Oddziaływania regulatorowych limfocytów T na komórki chłoniaków z komórek B” jest opracowaniem oryginalnym i wnosi nowe fakty do wiedzy na temat przeciwnowotworowych mechanizmów działania komórek Treg wobec badanych linii chłoniaków. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. Zm.). Tak więc spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. Mam przyjemność przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Marzeny Biernackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński
specjalista chorób wewnętrznych,
immunologii klinicznej i zdrowia publicznego
44 79808
Prof. dr hab. med. Jacek Roliński