



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

**Zakład Genetyki Klinicznej
ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin
tel./fax. 81 448 61 10**

Kierownik: dr hab. n. med. med. Janusz Kocki, prof. UM

Lublin, dnia 20. 10. 2015 r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt „Ocena aktywności komórek dendrytycznych u zwierząt zakażonych wirusem białaczki bydła (BLV)”

Mgr Eweliny Iwan

z Zakładu Biochemii

Państwowego Instytutu Weterynaryjnego

– Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

W odpowiedzi na prośbę prof. dr hab. Dariusza Bednarka, Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Iwan.

Uprzejmie informuję, że zapoznałem się z treścią manuskryptu rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Eweliny Iwan pt. „Ocena aktywności komórek dendrytycznych u zwierząt zakażonych wirusem białaczki bydła (BLV)”. Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora pracy, dr hab. Marii Szczotki, prof. nadzw. i promotora pomocniczego – dr Marzeny Roli-Łuszczak.

Rozprawa ma charakter monotematycznej monografii liczącej 128 stron, napisanej w formie wydruku komputerowego. Manuskrypt posiada typowy układ zgodny z wymogami stawianymi dysertacjom doktorskim. Złożony jest z następujących rozdziałów: *Wykaz skrótów* (str. 6-8), *Streszczenie* (str. 9-11), streszczenie w języku angielskim (str. 12-14), *Wstęp* (str. 15-44), *Cel pracy* (str. 45), *Opis układu doświadczeń* (str. 46-47), *Materiał i Metody* (str. 48-62), *Wyniki* (str. 63-87), *Dyskusja* (str. 88-102), *Wnioski* (str. 103), *Piśmiennictwo* (str. 105-128).

Rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne przedstawione w Art. 12. i 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późn. zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595).

Temat rozprawy doktorskiej dotyczy badań oceniających aktywność komórek dendrytycznych u zwierząt zakażonych wirusem białaczki bydła – BLV.

Komórki dendrytyczne, znane jako komórki prezentujące antygen, są wysoko wyspecjalizowanymi komórkami z funkcjami wychwytywania, przetwarzania i prezentacji antygenów limfocytom – zwłaszcza dziewczym. Biorą również udział w polaryzacji immunologicznej. Komórki dendrytyczne występują w różnych tkankach, dzięki czemu patogen jest wykrywany szybko a komórki efektorowe są pobudzone skutecznie i szybko. Komórki dendrytyczne są heterogenną grupą komórek ze względu na ich potencjał immunologiczny i możliwości zastosowania w immunoterapii. Pomimo wielu badań prowadzonych w ostatnich latach na komórkach dendrytycznych, ich rola w układzie immunologicznym nadal jest nieznana – szczególnie w warunkach klinicznej infekcji BLV. Temat realizowanej pracy wpisuje się w ten sposób w trendy literatury światowej dotyczącej tego zagadnienia.

We wstępie Doktorantka szeroko opisuje budowę i geny wirusa białaczki bydła (BLV) oraz regulację ich ekspresji. Kolejne rozdziały przedstawiają epidemiologię i patogenezę enzootycznej białaczki bydła oraz onkogenne właściwości BLV. Doktorantka przedstawia szeroką charakterystykę komórek dendrytycznych – ich klasyfikację, funkcje, znaczenie w układzie immunologicznym. Dalej znajduje się opis cytokin, sekwencji telomerowych i ich roli w komórce prawidłowej i nowotworowej. Układ wstępu bardzo dobrze wprowadza czytelnika w problematykę badawczą. Cennymi uzupełnieniami tej części pracy są dwie ryciny.

Uważam, że Autorka wyczerpująco dokonała analizy literatury dotyczącej zagadnień omówionych we wstępie. Po odpowiednim opracowaniu rozdział ten może stanowić publikację poglądową gotową do wysłania do druku.

Doktorantka postawiła ambitne cele pracy – ocenę sekrecji cytokin oraz aktywności telomerazy i długości telomerów w populacjach komórek dendrytycznych otrzymanych z krwi obwodowej i tkanek limfatycznych zwierząt zakażonych BLV. Cennym elementem pracy jest dalszy komentarz w postaci opisu układu doświadczeń.

Badania przeprowadzono na grupie krów serologicznie dodatnich rasy polskiej nizinnej czarno-białej, w wieku od 4 do 7 lat. Zakażenie potwierdzano testem ELISA oraz techniką *nested-PCR*. Poubojowo pobierano wycinki śledziony, węzłów chłonnych oraz szpiku. Komórki dendrytyczne generowano z monocytów CD14+, izolowanych z krwi, szpiku, węzłów chłonnych i śledziony. Materiał pobierano od 10 zwierząt naturalnie zakażonych BLV oraz 10 zwierząt niezakażonych, jako grupy kontrolnej. Z materiału pobranego od zwierząt naturalnie zakażonych, niezakażonych oraz w komórkach dendrytycznych wygenerowanych *in vitro* z monocytów zakażonych BLV *in vitro* oznaczano

profile sekrecyjne: Il-6, Il-10, Il-12(p40) i Il-12(p70). Eksperymentalne zakażenie BLV potwierdzano metodą PCR.

Z krwi zwierząt zakażonych i niezakażonych BLV izolowano komórki dendrytyczne mieloidalne i plazmacytoidalne oraz monocyty, z których generowano komórki dendrytyczne. Metodą cytometrii przepływowej oznaczano: Il-6, Il-10, Il-12(p40), Il-12(p70), IFN- γ i TNF- α .

W pracy oceniano aktywność trzech populacji komórek dendrytycznych: generowanych z monocytów, frakcji mieloidalnych i plazmatocytoidalnych. Materiał pochodził od 35 zwierząt naturalnie zakażonych BLV i 15 zwierząt niezakażonych; kontrolnych. W każdej z populacji komórek dendrytycznych oceniano profil sekrecyjny, aktywność telomerazy i długość sekwencji telomerowych. Stosowano metody cytometrii przepływowej, ELISA, *real-time* PCR, immunofluorescencyjną detekcję telomerazy oraz FISH. Wyniki badań porównywano z wynikami otrzymanymi z analizy czterech linii komórkowych: FLK-BLV, HeLa, Jurkat i 1301. Metodami molekularnymi wykrywano obecność prowirusa BLV we wszystkich generowanych komórek dendrytycznych i wszystkich komórkach dendrytycznych pochodzących od zwierząt naturalnie zakażonych.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, stosując powszechnie przyjęte metody oraz typowy poziom istotności. Analizę danych przeprowadzono w programie Statistica v. 10.

Dobór metod badawczych pozwolił na wielowątkowe badania laboratoryjne. Autorka w pracy zastosowała współczesne, trudne technicznie metody badawcze. Świadczy to dobrym jej przygotowaniu do prowadzenia badań naukowych.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka udokumentowała wyniki swoich badań w postaci 21 rycin i 6 tabel. Należy podkreślić, że przy bardzo dużej ilości otrzymanych wyników są one przejrzyste przedstawione i opisane w sposób bardzo przystępny dla czytelnika. Wysoko oceniam oryginalność planu badań, oryginalność zastosowanych metod badawczych i trud pracy włożony w ich wykonanie. Podkreślić należy wysokie umiejętności doktorantki na polu hodowli komórkowych. Sukcesem zakończyły się stymulowane hodowle komórkowe monocytów i otrzymanie komórek dendrytycznych w warunkach *in vitro*. Otrzymane komórki charakteryzowały się adhezją do podłoża, rozbudowanym systemem błon z wypustkami cytoplazmatycznymi i dużym jądrem komórkowym. Zdjęcia preparatów mikroskopowych komórek potwierdzają doskonały warsztat Doktorantki, wynikający zapewne z wieloletnich doświadczeń Promotora.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka udowodniła, że komórki dendrytyczne generowane z krwi zwierząt zakażonych BLV charakteryzowały się istotnym wzrostem sekrecji Il-6, Il-10 i Il-12(p40) w porównaniu do grupy kontrolnej. Komórki dendrytyczne izolowane ze śledziony lub węzłów chłonnych zakażonych zwierząt charakteryzował wzrost sekrecji Il-6 i Il-10, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu obu form Il-12. Doktorantka wysnuła słuszny wniosek, wskazujący na osłabienie odpowiedzi immunologicznej obserwowane w przewlekłych infekcjach wirusowych. Potwierdzają to również obserwacje zakażonych BLV komórek dendrytycznych, w których sekrecja wszystkich badanych cytokin była obniżona.

Mieloidalne komórki dendrytyczne zakażone BLV charakteryzowały się wzrostem poziomu Il-10 i Il-12(p70) oraz obniżonym poziomem IFN- γ . Wzrost sekrecji IFN- γ zaobserwowano w plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych. Zakażone komórki dendrytyczne wykazywały zwiększoną sekrecję Il-6, Il-12(p40) i TNF- α .

W badanych populacjach komórek dendrytycznych zwierząt zakażonych BLV zaobserwowano wzrost aktywności telomerazy przy jednoczesnym skróceniu telomerów. Komórki dendrytyczne mogą odgrywać również decydującą rolę w mechanizmach latencji i onkogenezy BLV.

Zaobserwowane różnice w profilach sekrecyjnych badanych komórek dendrytycznych wskazują na ich odmienne role w przebiegu infekcji BLV. Może to indukować proces nowotworowy i być przyczyną jego progresji.

Analiza wyników badań potwierdziła bardzo dobry dobór grup badawczych i bardzo dobre zaplanowanie doświadczeń. Otrzymane wyniki badań dają realne możliwości opracowania wartości referencyjnych badanych parametrów.

W dyskusji Autorka odniosła się krytycznie do otrzymanych wyników. Autorka podjęła udaną próbę porównania wyników własnych z wynikami publikowanymi w naukowym piśmiennictwie polskim i światowym. Rozdział „Dyskusja” uważam za bardzo istotne osiągnięcie tej pracy.

Brakuje mi jednak krótkiego podsumowania dyskusji i głosu Doktorantki, jakie znaczenie praktyczne mają badania przez nią wykonane. Czy obserwowane zmiany w profilach sekrecyjnych badanych populacji komórek dendrytycznych udowadniają czy też przeczą wykorzystaniu tej wiedzy w testach klinicznych?

Autorka w swoich badaniach wykorzystwała cztery linie komórkowe, nie podała jednak źródła ich otrzymania.

Przedstawione powyżej moje uwagi, jako recenzenta, nie zmniejszają wartości pracy ale powinny być rozważone w czasie przygotowania pracy do publikacji.

W pracy zamieszczono spis 262 publikacje w języku polskim i angielskim, w większości z ostatnich kilkunastu lat, prawidłowo cytowanych w tekście.

Rozprawa doktorska mgr Eweliny Iwan spełnia wszystkie warunki określone w Art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późn. zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595): została przygotowywana pod opieką promotora, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego przez Autorkę, wykazuje dużą, ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, staranność i dbałość w przygotowaniu manuskryptu rozprawy oraz potencjalne znaczenie dla przyszłych praktycznych aplikacji klinicznych, rozprawę oceniam pozytywnie i bardzo wysoko, stawiając wniosek do Wysokiej Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zgłaszam jednocześnie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Iwan ze względu na jej wzorcowe opracowanie. W uzasadnieniu wyróżnienia rozprawy doktorskiej jeszcze raz podkreślam nowatorski charakter badań oraz wszechstronne wykorzystanie umiejętności przez Doktorantki w planowaniu i wykonaniu skomplikowanych badań laboratoryjnych.

Kierownik
Zakładu Genetyki Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

prof. nadzw. UM dr hab. Janusz Kocki