

Prof. dr hab. Martyna Kandefer-Szerszeń
Zakład Wirusologii i Immunologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Lublin. 8.10.2015

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Eweliny Iwan pt. "Ocena aktywności komórek dendrytycznych u zwierząt zakażonych wirusem białaczki bydła (BLV)"

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana pod kierownictwem dr hab. Marii Szczotki w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym, Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach i dotyczy roli jaką pełnią komórki dendrytyczne w rozwoju infekcji wirusem białaczki bydła, badanej jako zdolność do wytwarzania cytokin przez różne populacje komórek dendrytycznych. Komórki izolowano z krwi oraz różnych narządów limfatycznych bydła, nosicieli tego wirusa. Komórki dendrytyczne były także zakażane BLV *in vitro* i ich odpowiedź na zakażenie wirusem była także badana.

Komórki dendrytyczne, których rola w odpowiedzi immunologicznej organizmu ssaków była wykryta później niż innych komórek immunologicznie kompetentnych, budzą duże zainteresowanie immunologów, ponieważ są one odpowiedzialne za jakość odpowiedzi immunologicznej. Uczestnicząc w rozwoju tolerancji na własne antygeny oraz w rozpoznaniu wszelkich zewnętrznych i wewnętrznych zagrożeń organizmu „dyrygują” rozwojem prawidłowej odpowiedzi immunologicznej humoralnej i komórkowej, lecz także

odpowiadają za rozwój chorób autoimmunologicznych. Modulacja ich aktywności w różnych stanach patologicznych jest przedmiotem badań wielu ośrodków naukowych. Posłużyły też do wytworzenia szczepionki przeciwnowotworowej przez „karmienie” komórek dendrytycznych antygenami nowotworowymi in vitro i następnie podanie ich chorym osobom. W przypadku białaczki bydła spowodowanej zakażeniem BLV rola komórek dendrytycznych w reakcji układu odpornościowego na wirusa i w ewentualnym rozwoju zmian nowotworowych jest nieznana.

W tę tematykę wpisuje się doskonale rozprawa doktorska mgr Eweliny Iwan.

Rozprawa ma typowy układ dla pracy eksperymentalnej i obejmuje 128 stron maszynopisu zawierającym Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję i Wnioski. Jest ilustrowana licznymi schematami, tabelami, wykresami i zdjęciami. Praca jest napisana ładnym i precyzyjnym językiem. Została zredagowana bardzo starannie i w tekście nie ma poważnych usterek językowych. Prezentacja graficzna wyników jest dobrej jakości. Rozprawa zawiera komplet rozdziałów oraz odpowiednią dokumentację wyników. Zaopatrzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów.

Pierwszą część pracy stanowi przegląd literaturowy, który oceniam jako bardzo dobry. Autorka przedstawiła w nim takie zagadnienia jak: budowa wirusa BLV, epidemiologię tego wirusa i białaczki bydła. Za najwartościowszy uważam rozdział 2 dotyczący komórek dendrytycznych, w którym Autorka scharakteryzowała je, opisała ich funkcje i znaczenie w układzie immunologicznym. Wysoko oceniam także rozdział 3, dotyczący cytokin, gdyż Autorka spośród wielu informacji na ich temat wybrała najważniejsze i dotyczące bezpośrednio pracy. Takie streszczenie szerokich wiadomości jest pewnego rodzaju umiejętnością, wynikającą z wiedzy. Przegląd piśmiennictwa

kończy opis telomerazy, telomerów oraz ich roli w biologii komórki. Podobnie jak poprzedni, ten rozdział wprowadza czytelnika w osiągnięcia ostatnich lat.

Na uznanie zasługuje także umiejętne stosowanie cytowań piśmiennictwa naukowego. W całej rozprawie cytowanych jest ponad 260 prac, w zdecydowanej większości opartej na najnowszej literaturze.

Jako cel swoich badań Autorka wybrała ocenę sekrecji cytokin oraz poziomu telomerazy i długości telomerów w populacjach komórek dendrytycznych generowanych z krwi i tkanek limfatycznych zwierząt zakażonych wirusem białaczki bydła. Cel sprecyzowany jest krótko, wyczerpująco i jasno.

W rozdziale Materiały i Metody Autorka przedstawiła bardzo szczegółowo użyte materiały i procedury badawcze. Są one dobrze opisane, reprezentują uznane i nowoczesne standardy i umożliwiają uzyskanie odpowiedniej jakości informacji naukowych. Chcę zwrócić uwagę na różnorodność metod, które Autorka stosowała w pracy. Są to techniki hodowli komórkowych *in vitro*, w tym generowanie komórek dendrytycznych z monocytów krwi pod wpływem cytokin, metody izolacji komórek z narządów limfatycznych oraz różnych subpopulacji komórek dendrytycznych z krwi. Poziom cytokin Autorka oznaczała dwoma metodami, ELISA oraz cytometrią przepływową, stosowała także techniki biologii molekularnej i mikroskopowe przy wykrywaniu prowirusa, poziomu telomerazy oraz mierzeniu długości telomerów.

Podsumowując aspekty metodyczne tej pracy stwierdzam, że jest ona wzorcowa dla badań nad rolą komórek dendrytycznych w układzie immunologicznym. Opanowanie różnorodnych metod z pewnością zaowocuje w przyszłej pracy naukowej Doktorantki. Autorka opanowała techniki, które zwykle wykonywane są przez wiele osób w zespołach badawczych.

Do istotnych osiągnięć tej pracy zaliczam metodologię pozwalającą uzyskać z różnych źródeł komórki dendrytyczne i ich hodowlę *in vitro*. Do istotnych osiągnięć zaliczam także badania nad telomerazą i długością telomerów w komórkach zakażonych wirusem. Zastanawiający jest fakt, że wraz ze wzrostem

stężenia telomerazy idzie skrócenie długości telomerów, co wymaga dalszych badań w celu wyjaśnienia tego zjawiska. Potrzebne jest także wyjaśnienie, dlaczego są zasadnicze różnice w poziomie wytwarzanych cytokin w komórkach dendrytycznych zakażanych *in vitro* oraz pochodzących od zwierząt naturalnie zakażonych, Czy nie dotyczy to „wyczerpania” sieci cytokin krótko po zakażeniu wirusem.

Bez wątplenia silną stroną pracy jest dyskusja wyników badań. Jest ona bardzo rozległa, szczegółowa i wielowątkowa. Autorka pokazała w niej swoją erudycję i umiejętność dyskusji z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy. Wnioski Autorka sformułowała zbyt dokładnie, w 11 punktach. W mojej opinii powinny być one bardziej ogólne.

Autorka nie ustrzegła się kilku niedociągnięć. Po pierwsze, dlaczego na wykresach nie wprowadziła danych odchylenia standardowego i istotności statystycznej. Wyszukiwanie tych informacji w tekście jest dużym utrudnieniem w ocenie wyników. Innym niedociągnięciem jest brak informacji czy hodowle komórek dendrytycznych były mieszaniną komórek uzyskanych z kilku osobników, czy z każdego zwierzęcia osobno. Mieszane hodowle komórek dendrytycznych mogą skutkować zwiększeniem produkcji cytokin po wzajemnym rozpoznanii się komórek różnych osobników. Dlaczego supernatanty z hodowli komórek poddawano liofilizacji. W różnych miejscach są informacje, że poziom cytokin przeliczano na mililitr lub milion komórek (str. 55). Która informacja jest prawdziwa. Dlaczego poziom telomerazy podawany jest na mikrolitr zamiast na mililitr. Nie byłoby tyle zer po przecinku. Poza tym w pracy oznaczano poziom telomerazy a nie jej aktywność enzymatyczną. Dlaczego istnieją takie duże różnice w poziomie IL-6 i IL-12 w supernatantach komórek dendrytycznych generowanych z monocytów krwi, jeśli poziom cytokin był badany testem ELISA oraz cytometrią przepływową (str. 73 i 82). Szkoda, że Autorka nie badała wytwarzania interferonu alfa przez komórki dendrytyczne, bo wiadomo, że jest on pierwszą

linią obrony przeciwwirusowej a komórki dendrytyczne są jego głównym źródłem w organizmie. Badała natomiast interferon gamma, który jest produkowany głównie przez limfocyty Th1 a nie komórki dendrytyczne.

Podsumowując całokształt rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Iwan stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa reprezentuje dobry poziom naukowy, wykazuje dogłębną znajomość problematyki i samodzielność myślenia oraz opanowanie przez Autorkę warsztatu naukowego. Uwagi dotyczące pracy nie wpływają na pozytywną końcową jej ocenę.

Na tej podstawie uznaję, że rozprawa doktorska mgr Eweliny Iwan z Instytutu Weterynaryjnego, Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach odpowiada w pełni wymogom ustawowym stawianym rozprawom na stopień doktorski i wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony.


Kierownik Zakładu
Prof. dr hab. Martyna Kandefer-Szerszeń