



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Zakład Genetyki Klinicznej

ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin

tel./fax. (081) 448 61 10

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

Lublin, dnia 23. 01. 2015 r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt „Kształtowanie się wybranych wskaźników odpowiedzi immunologicznej u psów z nowotworami okolicy okołodbytowej w aspekcie ich wykorzystania w monitorowaniu skuteczności leczenia”

mgr Urszuli Lisieckiej

z Katedry Epizootologii i Kliniki Chorób Zakaźnych

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

W odpowiedzi na prośbę prof. dr hab. Stanisława Winiarczyka, Dziekana Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Lisieckiej.

Uprzejmie informuję, że zapoznałem się z treścią manuskryptu rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Urszuli Lisieckiej pt. **„Kształtowanie się wybranych wskaźników odpowiedzi immunologicznej u psów z nowotworami okolicy okołodbytowej w aspekcie ich wykorzystania w monitorowaniu skuteczności leczenia”**. Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora pracy, prof. zw. dr hab. Krzysztofa Kostro.

Rozprawa ma charakter monotematycznej monografii liczącej 79 stron, napisanej w formie wydruku komputerowego. Manuskrypt posiada typowy układ zgodny z wymogami

stawianymi dysertacjom doktorskim. Złożony jest z następujących rozdziałów: *Wstęp* (str. 9-31), *Cel i uzasadnienie badań* (str. 32-33), *Materiał i Metody* (str. 34-37), *Wyniki* (str. 38-50), *Omówienie wyników* (str. 51-61), *Wnioski* (str. 62), *Piśmiennictwo* (str. 63-75), *Streszczenie w języku polskim* (str. 76-77), *Streszczenie w języku angielskim* (str. 78-79), *Wykaz skrótów* (str. 5-8).

Temat rozprawy doktorskiej dotyczy oceny wybranych wskaźników odpowiedzi immunologicznej u psów, u których stwierdzono nowotwory okolicy okołodbytowej. Choroba jest dużym problemem epidemiologicznym, wiele trudności sprawia jej diagnostyka i terapia.

Okolica odbytu u psów jest miejscem trudnym do opracowania chirurgicznego – często usunięcie guza tej okolicy jest niemożliwe – stąd obserwacje wznowy choroby nowotworowej. W literaturze przedmiotu poszukuje się skutecznych metod leczenia zachowawczego – w tym aspekcie temat rozprawy doktorskiej jest bardzo dobrze dobrany i wpisuje się we współczesne kierunki badań. Immunoterapia daje szansę dłuższego przeżycia i szansę na wyleczenie. Możliwość immunoterapii psów z nowotworami okolicy okołodbytowej wydają się bardzo słusznym podejściem praktycznym doktorantki. Temat realizowanej pracy wpisuje się w trendy literatury światowej dotyczącej tego zagadnienia oraz stanowi element jednej ze współczesnych strategii terapeutycznych dotyczących nowotworów.

Pojęcie immunoterapii nowotworów wywodzi się z teorii nadzoru immunologicznego Burneta, rozwijana przez wielu naukowców, m. in. w koncepcję immunoedycji nowotworowej (Dunn i wsp.). Zakładają one, że układ odpornościowy pełni rolę ochronną przed nowotworem. Komórki nowotworowe pojawiają się ciągle w organizmie – częściej niż choroba nowotworowa, dlatego, że w wyniku aktywacji odpowiednich mechanizmów

immunologicznych dochodzi do ich niszczenia. W przypadku obniżenia lub zniszczenia mechanizmów odpornościowych przetrwałe komórki nowotworowe dają początek chorobie nowotworowej. Immunoedycja nowotworowa składa się z faz: eliminacji, równowagi i ucieczki. Faza eliminacji to m. in. indukcja procesów zapalnych w odpowiedzi na detekcję komórek nowotworowych (udział komórek NK, limfocytów T, komórek dendrytycznych i makrofagów), indukowanie śmierci komórek nowotworowych przez interferon γ i chemokiny, hamowanie angiogenezy, fagocytozę, produkcję reaktywnych form tlenu. Niestety, w wyniku mutacji w komórkach nowotworowych często dochodzi do przejścia komórek nowotworowych w fazę równowagi i przetrwania „ataków” ze strony układu immunologicznego. W ostatniej fazie dochodzi do niekontrolowanego wzrostu komórek nowotworowych i objawów klinicznych – w sytuacji swoistej „bezradności” układu immunologicznego.

Jest wiele dowodów udziału układu immunologicznego w odpowiedzi na nowotwór: obecność limfocytów i makrofagów w otoczeniu komórek guza i w węzłach chłonnych. U pacjentów poddanych immunosupresji (po transplantacji, AIDS) częściej obserwuje się występowanie nowotworów.

We wstępie Doktorantka szeroko opisuje mechanizmy odpowiedzi immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej jako ważny problem kliniczny. Układ wstępu bardzo dobrze wprowadza czytelnika w problematykę badawczą. Doktorantka w sposób bardzo przemyślany opisuje poszczególne etapy nadzoru immunologicznego, mechanizmy ucieczki spod nadzoru immunologicznego, podatność komórek nowotworowych na komórki układu immunologicznego, interakcje komórek nowotworowych z komórkami układu immunologicznego i regulację procesu apoptozy komórek nowotworowych. Bardzo cennymi podrozdziałami „Wstępu” są *Immunodiagnostyka i Immunoterapia nowotworów*.

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: porównawczą ocenę profilu odpowiedzi immunologicznej u psów z nowotworami okolicy okołodbytowej o charakterze złośliwym i łagodnym w aspekcie wykorzystania wybranych wskaźników immunologicznych do monitorowania skuteczności zastosowanego leczenia zachowawczego.

Badania wykonano na 32 psach samcach rasy mieszanej. Zwierzęta podzielono na cztery grupy doświadczalne z nowotworami okolicy okołodbytowej i jedną grupę kontrolną. Grupy doświadczalne dobrano w taki sposób, aby różniły się poziomem hormonów. I grupa – zwierzęta z łagodnymi nowotworami z podwyższonym poziomem estrogenów, II grupa – zwierzęta z nowotworami łagodnymi z podwyższonym poziomem testosteronu, III grupa – zwierzęta z nowotworami złośliwymi z podwyższonym poziomem estrogenów i IV grupa – psy z nowotworem złośliwym i podwyższonym poziomem testosteronu. Grupę kontrolną stanowiły psy klinicznie zdrowe, w podobnym wieku. Psom z grup doświadczalnych podawano Tamoxifen lub Androcur przez okres 1 miesiąca. Psom z grupy kontrolnej podawano placebo.

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa i biopaty gruczołów okołodbytowych.

Próbki krwi obwodowej pobierano przed rozpoczęciem leczenia, po 1. miesiącu leczenia i po trzecim miesiącu leczenia.

Biopaty pobierano za pomocą trepanu od zwierząt ze wszystkich grup. Ocenę morfologiczną badanych tkanek wykonano wg klasyfikacji guzów skóry opracowanej przez WHO.

Autorka w pracy zastosowała współczesne, trudne technicznie metody badawcze. Badania odpowiedzi immunologicznej wykonano przez analizę cytometryczną poziomu ekspresji wielu antygenów powierzchniowych jak i wewnątrzcytoplazmatycznych. Analizę cytometryczną przeprowadzono z zastosowaniem specyficznych przeciwciał w cytometrze przepływowym Epics XL Beckman-Coulter. Dodatkowo, stężenia sześciu białek oznaczano w surowicy badanych zwierząt metodą ELISA.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka udokumentowała w postaci 15 przejrzyście wykonanych rycin. Wysoko oceniam oryginalność zastosowanych metod i trud pracy włożony w ich wykonanie.

Wyniki badań. Analiza cytometryczna subpopulacji limfocytów CD3⁺ wykazała ich niższy poziom w czasie „0” we wszystkich grupach badawczych w stosunku do grupy kontrolnej oraz obniżenie ich poziomu po pierwszym i po trzecim miesiącu obserwacji w grupach nowotworów łagodnych oraz po pierwszym miesiącu obserwacji w grupach zwierząt z nowotworami złośliwymi.

Analiza cytometryczna subpopulacji limfocytów CD21⁺ wykazała ich wyższy poziom w czasie „0” we wszystkich grupach badawczych w stosunku do grupy kontrolnej oraz obniżenie ich poziomu po pierwszym i po trzecim miesiącu obserwacji w grupach nowotworów łagodnych oraz po pierwszym miesiącu obserwacji w grupach zwierząt z nowotworami złośliwymi.

Analiza cytometryczna subpopulacji limfocytów CD8⁺, CD4⁺ i CD5low⁺, MHC II⁺ wykazała ich niższy poziom w czasie „0” we wszystkich grupach badawczych (oprócz CD5low) w stosunku do grupy kontrolnej oraz wzrost ich poziomu po pierwszym i po trzecim miesiącu obserwacji w grupach nowotworów łagodnych oraz obniżenie poziomu po

pierwszym miesiącu obserwacji - w grupach zwierząt z nowotworami złośliwymi. Wyniki tych badań różnicują nowotwory łagodne i złośliwe.

Analiza cytometryczna subpopulacji limfocytów CD14⁺ wykazała ich niższy poziom w czasie „0” w I, II i IV grupach badawczych w stosunku do grupy kontrolnej oraz obniżenie ich poziomu po pierwszym i po trzecim miesiącu obserwacji w grupach nowotworów łagodnych oraz po pierwszym miesiącu obserwacji w grupie III i niewielki wzrost w grupie IV - zwierząt z nowotworami złośliwymi.

Analiza cytometryczna subpopulacji limfocytów CD4⁺/CD25⁺ wykazała ich wyższy poziom w czasie „0” we wszystkich grupach badawczych w stosunku do grupy kontrolnej oraz obniżenie ich poziomu po pierwszym i po trzecim miesiącu obserwacji w grupach nowotworów łagodnych oraz wzrost po pierwszym miesiącu obserwacji w grupach zwierząt z nowotworami złośliwymi.

Analiza cytometryczna subpopulacji limfocytów CD4⁺/Foxp3⁺ wykazała ich niższy poziom w czasie „0” w grupach nowotworów łagodnych i wyższy poziom w grupach nowotworów złośliwych - w stosunku do grupy kontrolnej oraz wzrost ich poziomu po pierwszym i po trzecim miesiącu obserwacji w grupach nowotworów łagodnych oraz po pierwszym miesiącu obserwacji w grupach zwierząt z nowotworami złośliwymi. Wyniki tych badań wskazują na odmienną odpowiedź immunologiczną między grupami nowotworów łagodnych i złośliwych.

Wyniki badań wykonanych metodą ELISA różnicują nowotwory łagodne i złośliwe u psów. Średnie wartości stężenia białek: Hp, SAA i CRP i były wyższe w czasie „0” w stosunku do średnich wartości w grupie kontrolnej; w grupach nowotworów łagodnych poziom tych białek obniżał się ale w grupach nowotworów złośliwych wzrastał po miesiącu obserwacji.

Średnie wartości stężenia białka TGFβ w grupach nowotworów łagodnych był bliski zeru (podobnie u zwierząt kontrolnych) ale w grupach nowotworów złośliwych był wyższy i wzrastał po miesiącu obserwacji.

Średnie poziomy stężenie Il-2 i Il-10 były wyższe w stosunku do kontroli – we wszystkich grupach zwierząt doświadczalnych i obniżały się po zastosowaniu leczenia.

W dyskusji Autorka odniosła się krytycznie do otrzymanych wyników, co nie było łatwe, gdyż prawdopodobnie jest to pierwsza publikacja na ten temat. Autorka podjęła udaną próbę porównania wyników własnych z wynikami publikowanymi w naukowym piśmiennictwie polskim i światowym. Podrozdziały dyskusji uważam za bardzo istotne osiągnięcie tej pracy.

W pracy zamieszczono spis 119 publikacji prawidłowo cytowanych w tekście.

Z pozycji recenzenta przedstawiam spis drobnych błędów literowych i uwag, które nie zmniejszają wartości pracy ale powinny być rozważone w czasie przygotowania pracy do publikacji:

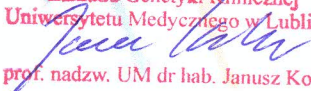
- Umieszczenie w porządku alfabetycznym skrótów w „Wykazie skrótów” znacznie ułatwiłoby korzystanie z tego podrozdziału
- Wielokrotne użycie słowa „iż” powinno być zastąpione słowem „że”

W pracy nie znalazłem informacji nt. zgody na badania Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach.

Rozprawa doktorska **mgr Urszuli Lisieckiej** stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego przez Autorkę i wykazuje jej dużą ogólną wiedzę teoretyczną w reprezentowanej dyscyplinie naukowej. Rozprawa doktorska mgr Urszuli Lisieckiej odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

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 Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zgłaszam jednocześnie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej **mgr Urszuli Lisieckiej** ze względu na jej wzorcowe opracowanie. W uzasadnieniu wyróżnienia rozprawy doktorskiej jeszcze raz podkreślam nowatorski charakter badań oraz wszechstronne wykorzystanie umiejętności przez Doktorantkę: zarówno doskonałe opracowanie kliniczne materiału jak również zastosowanie i wykorzystanie nowoczesnych metod laboratoryjnych.

Kierownik
Zakładu Genetyki Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

prof. nadzw. UM dr hab. Janusz Kocki