

prof. dr hab. Dariusz Bednarek
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy
Al. Partyzantów 57
24-100 Puławy

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr **Adrianny Izabeli Dudek**
pt. „**Indukowanie różnicowania monocytów do makrofagów
czynnikami wydzielanymi przez komórki raka jelita grubego**”

przygotowanej w Zakładzie Wirusologii i Immunologii
Wydziału Biologii i Biotechnologii
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
pod kierunkiem **prof. dr hab. Martynty Kandefer-Szerszeń**
oraz **dr Katarzyny Sawa-Wejsza**, jako promotora pomocniczego.

Praca dotyczy ważnego i wykazującego niestety stałą tendencję wzrostową problemu chorób nowotworowych końcowego odcinka przewodu pokarmowego człowieka, przebiegających najczęściej w postaci raka jelita grubego, oraz badań nad immunopatomechanizmem tych zaburzeń, których praktycznym rezultatem może być w przyszłości opracowanie bardziej skutecznych metod ich leczenia i wczesnej profilaktyki, zwłaszcza poprzez przestrojenie mechanizmów ekspresji guza i hamowania procesu jego tworzenia. Kluczowym etapem nowotworzenia w generowaniu zwykle nieodwracalnych zmian w jelicie grubym wydają się mieć zjawiska immunologiczne prowadzące do przekształcania pierwotnie proimmunologicznych komórek efektorowych układu odpornościowego gospodarza (monocytów, makrofagów) do form o charakterze immunosupresyjnym promującym niekontrolowaną progresję nowotworu. Formy te o zmienionym fenotypie współdziałając aktywnie z nowotworem wytwarzają w jego mikrośrodkowisku liczne aktywne substancje (chemokiny, cytokiny, proteazy, czynniki wzrostowe), które mogą stymulować angiogenezę, intensywny wzrost guza nowotorowego, ułatwiać jego tzw. przerzutowanie poprzedzone przejściem epitelialno-mezenchymalnym (EMT), a przed wszystkim upośledzać istotnie miejscową efektywną odpowiedź immunologiczną, ograniczając tym samym możliwość skutecznej obrony antynowotworowej organizmu gospodarza. Większość dotychczasowych danych na ten temat, poznanych przy okazji badań innych nowotworów, były odnoszone drogą analogii również do patomechanizmu raka jelita grubego. W przypadku tego

ostatniego, dostępne dane nie są jednak w pełni jednoznaczne i do końca przekonujące, często są one przy tym sprzeczne i wykluczają się wzajemnie, a przyjęty zunifikowany model nowotworzenia może być obecnie kwestionowany. Stąd paląca potrzeba nowych badań w tym zakresie podejmowanych na świecie, w których swój znaczący udział znalazła również Doktorantka.

Autorka dysertacji podejmując się tego wyzwania oparła swoje założenia badawcze na kluczowej roli specyficznej subpopulacji makrofagów w generowaniu i progresji zmian nowotworowych, których aktywny, odpowiedzialny za to immunosupresyjny fenotyp tych komórek efektorowych, powstaje w następstwie działania rozwijającego się nowotworu. Doktorantka, przyjmując ich wiodącą rolę w progresji nowotworowej dążyła do wyjaśnienia mechanizmów ukierunkowanego różnicowania tych komórek określanych jako M2 - o zdecydowanie supresyjnym i pronowotworowym charakterze oraz makrofagów linii M1, tj. prozapalnych i przeciwnowotworowych powstających z monocytów aktywnie ściąganych do mikrośrodowiska nowotworu z oceną kierunków tych zmian, ich intensywności i dominujących tendencji. Ponadto, chciała ona wyjaśnić czy aktualne stadium badanego nowotworu może wpływać na proces różnicowania wspomnianych frakcji komórkowych. Omawiane założenia stanowiły cel pracy doktorskiej, a o jej podjęciu zadecydowały niewątpliwie pewne spotykane w literaturze niejasności i luki dotyczące unikalnej materii badawczej jaką jest poznanie roli makrofagów związanych z nowotworem (TAMs, tumor-associated macrophages) w jego różnicowaniu i progresji zwłaszcza w odniesieniu do raka jelita grubego. Zadanie to nie jest jednak łatwe, komórki TAMs mimo charakterystycznych uławiających ich wstępne różnicowanie markerów, charakteryzują się bowiem wyjątkową złożonością w działaniu poprzez produkcję licznych aktywnych czynników macierzy zewnątrzkomórkowej nowotworu oraz całej gamy różnorodnych cytokin, chemokin, a nawet białek szoku termicznego (hsp).

Do realizacji postawionego, bardzo ambitnego celu pracy Doktorantka wykorzystwała nowoczesny warsztat badawczy, w którym cytometria przepływowa (FCM) jawi się jako podstawowe narzędzie służące do wiarygodnej oceny kształtowania się wybranych populacji komórek immunologicznie kompetentnych, w tym również makrofagów występujących w różnych mikrośrodowiskach i stadiach rozwojowych raka jelita grubego badanych w oparciu o specyficzne dla niego linie komórkowe (HT29, LS180, SW948, SW620, THP1, HSF; wykorzystano w sumie 7

linii w tym z prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej – HSF oraz linii THP1 stanowiących model monocytów ludzkich). Cztery pierwsze z wykorzystanych w badaniach linii komórkowych, odpowiednio: HT29, LS180, SW948, SW620, reprezentują przede wszystkim kolejne stadia rozwojowe raka jelita grubego. Natomiast kontrolą w podjętych badaniach była linia komórkowa HSF pochodząca z fibroblastów skóry zdrowych ludzi, a modelem ludzkich monocytów były komórki z linii białaczkowej THP-1 człowieka, które preaktywowane z udziałem PMA (ester forbolu) stanowiły też model dla makrofagów spoczynkowych. Z kolei podłoża pohodowlane (CM, conditioned media) znad użytych linii komórkowych stanowiły model mikrośrodowiska nowotworu i pozwalały oceniać żywotność poszczególnych różnicujących się frakcji komórkowych (monocytów, makrofagów) zdolność ich do produkcji wolnych rodników i specyficznych cytokin oraz ekspresję charakterystycznych markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych, a także genów i białek przez nie kodowanych i metaloproteinaz w trakcie ich inkubacji (72 h).

Przygotowana praca doktorska poprzez najbardziej adekwatny dobór technik badawczych zapewniających ich wiarygodność ma duże walory poznawcze, jak też potencjalnie aplikacyjne, przy odpowiednim wykorzystaniu uzyskanych rezultatów badań w praktyce klinicznej w tworzeniu strategii skutecznego kontrolowania procesu różnicowania poszczególnych frakcji komórkowych do tych immunologicznie przydatnych w procesie remisji zmian nowotworowych. W oparciu o uzyskane dane już teraz rysuje się realna możliwość wypracowania nowych metod leczenia raka jelita grubego z wykorzystaniem nowych generacji leków sterujących precyzyjnie patomechanizmem zjawisk immunologicznych na poziomie komórkowym. Temu celowi przyświecała też po części warstwa merytoryczna pracy, mimo że, jej istotą w części *stricte* badawczej było poznanie zjawisk zachodzących w mikrośrodowisku różnych stadiów raka jelita grubego na poziomie wzajemnych zależności nowotwór i jego sekrecyjne czynniki, a różnicowanie i rola komórek linii mieloidalnej organizmu gospodarza w rozwoju i progresji zmian nowotworowych. Badania z tego zakresu prowadzone na świecie zmierzające do pełnego poznania patomechanizmu nowotworzenia w relacji z upośledzoną i sprzyjającą temu odpowiedzią immunologiczną gospodarza wymagają nadal dużego zaangażowania. Poziom tych badań i ich wartość, a przede wszystkim wiarygodność zależy jednak w dużym stopniu od doboru odpowiednich narzędzi i metod badawczych. Dlatego też, warto w tym miejscu podkreślić zasadność doboru przez Doktorantkę odpowiedniego panelu

metod badawczych oceniających całą gamę wzajemnie uzupełniających się wskaźników immunologicznych, dających w rezultacie szeroki wgląd w obserwowane zjawiska, z możliwością pozyskania pełnej wiedzy z zakresu mechanizmów i interakcji na poziomie gospodarz-nowotwór w obrębie mikrośrodowiska powstającego w przebiegu nowotworzenia. Takie podejście pozwala bardziej wnikliwie, a przez to potencjalnie i perspektywicznie bardziej aplikacyjnie, rozpoznać i wykorzystać badane zjawiska oraz tworzyć w oparciu o uzyskaną wiedzę podstawową nowe modele i strategie immunoterapii nowotworów człowieka, zwłaszcza raka jelita grubego będącego przedmiotem dysertacji.

Recenzowana praca doktorska (zgodnie z wytycznymi ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki art. 12 pkt. 2. przygotowana jako „manuskrypt książki”) ma układ typowy dla tego typu opracowań i liczy w sumie 162 strony maszynopisu. Zawiera ona kolejno: stronę tytułową, krótką informację o źródle finansowania badań będących przedmiotem dysertacji (grant badawczy Sonata NCN, nr 2013/09/D/NZ6?02564), podziękowania, spis treści, wykaz przyjętych skrótów, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo (liczące 150 pozycji na 14 stronach) oraz, na samym końcu opracowania, rozdział zatytułowany: „Spis rycin i tabel”. Dokumentacja graficzna wyników badań oraz dodatkowych danych do części opisowej pracy przedstawiona została na 62 kolorowych rycinach wkomponowanych w tekst opracowania (w rozdziale: „Wstęp” i „Wyniki”). Praca zawiera też jedną tabelę zamieszczoną we wstępie, która zestawia obszerną „Charakterystykę markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych monocytów i makrofagów z różnicowaniem na ich subpopulacje” i jest w pełni autorskim opracowaniem Doktorantki.

Tytuł przedstawionej do recenzji dysertacji doktorskiej odzwierciedla istotę zjawiska, które było przedmiotem szczegółowych badań Doktorantki zmierzających do wyjaśnienia jego patomechanizmu w warunkach eksperymentalnych odwzorowujących specyficzne mikrośrodowisko towarzyszące klinicznej formie raka jelita grubego. Kolejny, obszerny rozdział wstępu rozprawy doktorskiej, wprowadza czytelnika w usystematyzowany i przejrzysty sposób w problem karcenogenezy powiązanej z ogólnymi danymi odnośnie samego nowotworu jelita grubego (czynniki ryzyka, epidemiologia, klasyfikacja, objawy, rozpoznawanie oraz profilaktyka i

leczenie) ale także, poprzez pryzmat współuczestniczących w jego patologii różnorodnych immunologicznych komponentów komórkowych i humoralnych, szczegółowo opisuje wspólne ich zależności.

Znaczna część „Wstępu” poświęcona jest też bardzo ważnym aspektem mikrośrodowiska nowotworu (podrozdz. 6), w którym niektóre komórki układu immunologicznego wydają się być kluczową składową w progresji zmian nowotworowych, tworzą się też w nim specyficzne warunki immunotolerancji organizmu gospodarza dla nowotworu, a ostatecznym efektem tych zmian jest jego niekontrolowany rozwój i w perspektywie złe rokowanie. Cały rozdział „Wstępu” liczy w sumie 30 stron maszynopisu i wielkością zachowuje w zasadzie właściwe proporcje w porównaniu do pozostałych części pracy. Warto podkreślić przy tym, że wstęp napisano bardzo starannie, z dużą dbałością o jego warstwę merytoryczną, stylistykę pracy i chronologiczny układ tekstowy poszczególnych jego podrozdziałów, ułatwiający całościowe zrozumienie problemu. Świadczy to o dobrym przygotowaniu teoretycznym i zdolnościach edytorskich Doktorantki w tym zakresie, również co do ogólnie przyjętych zasad publikowania prac naukowych, znajomości aktualnego piśmiennictwa oraz dużych umiejętności we właściwym doborze cytowanych pozycji.

Część doświadczalna opiniowanej rozprawy doktorskiej rozpoczyna się od jasno sformułowanego ogólnego celu pracy powiązanego z dwoma bardziej szczegółowymi kierunkami planowanych badań immunologicznych, które precyzują istotę celu pracy i wybór narzędzi do jego realizacji.

Kolejny rozdział zawiera opis materiałów i metod użytych do badań. Należy podkreślić zwłaszcza wyjątkowo bogaty i różnorodny zestaw materiałów użytych w pracy doktorskiej obejmujący przede wszystkim bardzo unikalny panel linii komórkowych reprezentujących kolejne stadia rozwojowe raka jelita grubego, szeroki wykaz podłoży i płynów hodowlanych, licznych zastosowanych reagentów oraz zestawów badawczych i sprzętu laboratoryjnego.

W tej części pracy Doktorantka opisując użyte metody badawcze, bardzo obszernie przedstawiła ich szczegółowe metodyki, a ich różnorodność miała bez wątpienia wpływ na osiągnięcie wszechstronnego wglądu w oceniane zjawiska. Z użyciem zwłaszcza nowoczesnych technik cytometrii przepływowej (FCM) badano m.in. wiele ważnych na etapie nowotworzenia mechanizmów immunologicznych wybranych subpopulacji komórek bezpośrednio zaangażowanych w tym procesie (monocytów i makrofagów) takich jak, ich żywotność (z udziałem barwienia jodkiem

propidyny), zdolność produkcji wolnych rodników tlenowych (barwienie DCF) oraz poziom ekspresji charakterystycznych dla tych komórek markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych (CD11b, CD163, CD206, Cd14, CD204, B7H1, CD40, HLA-DR, IDO, CD68). Ważnym etapem wielokierunkowej oceny było również badanie zdolności hamowania proliferacji komórek linii THP-1, tj. monocytów ludzkich i makrofagów pod wpływem zastosowanych podłoży pochodowlanych (CM) stanowiących interesujące badacza mikrośrodowisko nowotworu z wykorzystaniem testu MTT (na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej) oraz BrdU tj. testu inkorporacji analogu tymidyny do nowo syntetyzowanego DNA. W badaniach Doktorantka wykorzystwała też szeroko stosowane obecnie w różnych badaniach immunologicznych komercyjne testy ELISA do oceny aktywności wybranych cytokin uwalnianych przez aktywowane monocyty i makrofagi (VEGF, IL-10 i IL-6). Z kolei za pomocą metod molekularnych (qRT-PCR) oceniała poziom ekspresji wybranych genów monocytów i makrofagów (*iNOS*, *ARC1*, *IDO1*, *LGALS3*, *LGALS9*) odpowiedzialnych za syntezę białek ważnych w procesie rozwoju nowotworu i jego zdolności do przerzutów.

Bezspornie, jeszcze raz należy to podkreślić, że tak bogaty i zróżnicowany panel zastosowanych metod badawczych pozwolił na wielowątkowy wgląd w patomechanizm zjawisk immunologicznych na poziomie interakcji nowotwór a wybrane subpopulacje komórek odpornościowych gospodarza, obserwowanych w modelowym mikrośrodowisku raka jelita grubego u człowieka. Należy też dodać, że zaplanowana metodyka badań wymagała ze strony Doktorantki dużego osobistego zaangażowania w opanowanie zastosowanych technik badawczych oraz niezbędnego czasu na ich doskonalenie w toku realizacji założonych celów. Świadczy to również, o wszechstronnym technicznym przygotowaniu Doktorantki do pracy laboratoryjnej zważywszy na to, że zastosowane metody badawcze, w tym zwłaszcza cytometria przepływowa (FCM), są niewątpliwie wyjątkowo złożonymi i wymagającymi dobrego przygotowania aplikacyjnego technikami badań immunologicznych. W zamian dają one jednak bardziej wiarygodne i rzetelne wyniki badawcze, których końcowa analiza może posłużyć do wyciągnięcia o wiele bardziej wnikliwych oraz zbliżonych do stanu faktycznego - wniosków, a także stać się punktem wyjścia do dalszych aplikacyjnych zastosowań.

Realizując konsekwentnie zaplanowany harmonogram pracy Doktorantka w pierwszej kolejności skoncentrowała się na badaniach cytometrycznych oceniając

poziom ekspresji wymienionych już specyficznych markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych badanych subpopulacji komórek różnicujących się w mikrośrodowisku nowotworu, a także ich żywotność oraz efektywność generowania wolnych rodników tlenowych (ROS). Następnie skoncentrowała się na badaniu innych ważnych parametrów odpowiedzi immunologicznej (MTT, BrdU, poziom cytokin) oraz ekspresji specyficznych genów w monocytach i makrofagach kodujących białka ważne w procesie nowotworzenia, a także, w ostatnim etapie realizowanego eksperymentu, analizowała występowanie białek związanych z metastazą (galaktyna 3 i 9) oraz obecność metaloproteinaz (MMP-9) z wykorzystaniem odpowiednich metod, tj. Western blottingu i zymografii żelatynowej.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorantka wykazała, że podłoża pohodowlane (CM), stanowiące modelowe mikrośrodowisko odpowiadające warunkom panującym na etapie intensywnego rozwoju i następnej sekrecji nowotworu, powodują przyspieszenie różnicowania monocytów do makrofagów, zmniejszając przy tym ich proliferację i zatrzymując ich cykl komórkowy w fazie G1, a także wywołując spadek liczebności badanych komórek w fazie S i G2. We wspomnianym środowisku dochodziło również u obecnych tam monocytów i makrofagów do wzmożonej produkcji wolnych rodników tlenowych oraz wzrostu ekspresji markerów charakterystycznych dla subpopulacji M1 i M2 makrofagów. Wyraźna aktywizacja została również wykazana w odniesieniu do ekspresji specyficznych genów obecnych w genomie ocenianych komórek efektorowych, odpowiedzialnych za syntezę białek biorących udział w nowotworzeniu. Wzrastało ponadto stężenie wybranych cytokin, białek uczestniczących w metastazie (galaktyny) oraz metaloproteinaz (MMP-9) uwalnianych przez makrofagi aktywowane w mikrośrodowisku nowotworu. Należy też dodać, że linie nowotworowe, użyte do przygotowania modelowych podłoży pohodowlanych (CM), stanowiły całościowy przekrój przez różne stadia raka jelita grubego i generalnie wykazywały one podobny wpływ na monocyty i makrofagi. Z pewnym istotnym jednak wyjątkiem dla linii HT29, tj. złożonej z komórek nabłonkowych raka jelita grubego, która wykazywała najsilniejszy wpływ na żywotność makrofagów i ekspresję ocenianych markerów oraz przerzutowej linii SW620 złożonej z komórek wyizolowanych z węzłów chłonnych gruczolaka jelita grubego, przy których udziale stwierdzone różnice dotyczyły ekspresji galaktyn.

Reasumując, badania wykonane przez Doktorantkę w bardzo wnikliwy i przekonujący sposób dokumentują zaobserwowane tendencje i kierunki zmian w zakresie odpowiedzi immunologicznej wybranych frakcji komórek linii mieloidalnej obecnych w mikrośrodowisku odpowiadającym różnym stadiom raka jelita grubego człowieka. W końcowym podsumowaniu z wykonanych badań Autorka przytacza, szczególnie ważny z punktu widzenia ewentualnych przyszłych zastosowań aplikacyjnych fakt, że w mikrośrodowisku raka jelita grubego mamy do czynienia z mieszaniną komórek monocytów oraz makrofagów o różnych fenotypach (M1, M2, TAM) obejmujących zarówno te, o potencjalnie pożądanym cechach w bezpośredniej walce z nowotworem jak i tych, zwiększających jego niekontrolowaną progresję. Dlatego też, przyszłe praktyczne programy walki z rakiem jelita grubego człowieka powinny uwzględniać również te wykazane i potwierdzone przez Doktorantkę zależności, które jednak przed ostatecznym zastosowaniem w praktyce klinicznej wymagają jeszcze potwierdzenia ich również w badaniach *in vivo*, aby przyjęty na ich podstawie schemat postępowania przeciwnowotworowego był jak najbardziej skuteczny. Uwzględniając otrzymane wyniki badań z modelu *in vitro* można jednak już teraz wskazać potencjalne drogi rozwoju nowych leków przeciw rakowi jelita grubego, polegające, jak stwierdza sama Doktorantka, na inhibicji procesu przekształcania się monocytów oraz makrofagów prozapalnych przeciwnowotworowych w komórki promujące rozwój nowotworu.

Wykonane badania istotnie przybliżają nas do poznania skomplikowanych mechanizmów zjawisk związanych z nowotworzeniem w okolicy końcowego odcinka przewodu pokarmowego człowieka, które rozpatrywane były dotychczas raczej pod kątem stosowanych terapii i poprawy ich efektywności, mniej zwracano uwagę na złożoność zjawisk immunologicznych i patomechanizm rozwoju nowotworu na poziomie komórkowym. W przyjętym bardziej kompleksowym podejściu do problemu, który wybrała Doktorantka i realizowała konsekwentnie do końca, można było uzyskać bardziej wszechstronne i obiecujące dane o czym świadczą m.in. uzyskane wyniki, które pozwoliły Autorce na sformułowanie aż 12, nieco może zbyt szczegółowych, wniosków podsumowujących wszystko co udało się w pracy wykazać.

Z obowiązku Recenzenta należy jednak zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia, których nie ustrzegła się Autorka w trakcie przygotowywania dysertacji doktorskiej. W większości są one jednak natury stylistyczno-edytorskiej i

porządkowej, a ich korekta pozwoli na bardziej przejrzystą formę w trakcie ostatecznej publikacji pracy do druku. Poniżej, niektóre z nich:

1. Pod względem edycji należy zwrócić uwagę na częste w pracy fragmenty zlewającego się tekstu poczynając już od anglojęzycznej wersji tytułu dysertacji poprzez wiele innych jej miejsc (przykładowo: str. 11, 14, 16 itd.) lub fragmenty w których jest od rozstrzelony (np. str. 18). Trzeba to bezwzględnie poddać odpowiedniej korekcji.
2. W przypadku przyjętego sposobu cytowań prac prezentowanych w dysertacji jako pozycje literaturowe, należy przyjąć zunifikowaną jego formę, tj. albo: **Autor i wsp.**, i data opublikowania lub **Autor i in.**, oraz data, a nie stosować jednocześnie obu tych form (patrz str. 31). Ponadto, przy pracach dwuautorskich jednocześnie podaje się dwa nazwiska i to bez inicjałów imion autorów (str. 29), a nie używa się skróconej formy: *Autor i in.* (np. str. 23). Z kolei w wykazie piśmiennictwa przedstawiając poszczególne jego pozycje należy obligatoryjnie wymieniać wszystkich autorów danej pracy, a nie stosować dla odmiany w tym przypadku skróconej formy: *Autorzy i in.*, która zwyczajowo przywidziana jest do umieszczania cytowanych pozycji w tekście pracy (str. 156, poz. 136, 139, 140).
3. Na koniec należy też zwrócić uwagę na to, że nie wszystkie cytowane w pracy pozycje znajdują się również w wykazie piśmiennictwa np. brakuje pozycji , „**Łacko, 2008**” cytowanej na str. 33, a niektóre z nich są powielone (poz. 82 i 83), mimo przyjętych różnych (a, b) literowych oznaczeń tego samego rocznika jednak tom, nr czasopisma i strony pracy są te same w obu poz.: *Mantovani, A., Sica, A. (2010a i b). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. Current Opinion in Immunology, 22(2), 231-237. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2010.01.009>*

Poza tym, nasuwa się pytanie natury bardziej ogólnej i dającej asumpt do szerszej dyskusji, a zdając sobie sprawę ze złożoności podjętego tematu badań i założonego, nieco odmiennego od istoty pytania, celu pracy doktorskiej odpowiedź może być wyjątkowo trudna i nie jednoznaczna, mianowicie, jaki jest właściwie bezpośredni udział nowotworu, tj. raka jelita grubego w odniesieniu do otrzymanych rezultatów badań, to znaczy jakie w zasadzie jego indywidualne czynniki czy sygnały inicjujące, w większości

prawdopodobnie sekrecyjne lub być może też innego charakteru, wpłynęły w ten, czy inny wykazany w pracy sposób na oceniane frakcje komórkowe dając w efekcie określone jakościowe zmiany, często przy tym zbliżone do siebie, mimo różnorodności wykorzystanych linii komórkowych uzyskanych z odmiennych klinicznie przypadków chorobowych.

Wspomniane i zawarte w tekście uwagi nie mają jednak istotnego wpływu na ogólną bardzo dobrą ocenę przygotowanej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że recenzowana rozprawa doktorska wnosi nowe, istotne dane do nauki i w sposób znaczący pogłębia wiedzę z zakresu immunologii nowotworzenia raka jelita grubego człowieka oraz udziału w nim nowo różnicujących się subpopulacji komórek powstających w jego mikrośrodku. Pani mgr Adrianna Izabela Dudek dobrze wywiązała się z postawionego sobie zadania. Doświadczenia zaplanowała prawidłowo i dokładnie je wykonała, przy użyciu powszechnie akceptowanych, nowoczesnych metod badawczych, gwarantujących wiarygodność uzyskiwanych wyników. W pracy zamieszczono rzetelnie wykonaną dokumentację graficzną z przeprowadzonych badań, która ułatwia czytającemu weryfikację prezentowanych wyników badań.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pani **mgr Adrianny Izabeli Dudek** pt. **„Indukowanie różnicowania monocytów do makrofagów czynnikami wydzielanymi przez komórki raka jelita grubego”** odpowiada warunkom określonym w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Adrianny Izabeli Dudek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoki poziom naukowy prezentowanego dzieła, wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Puławy, 20.07. 2018 r.

prof. dr hab. Dariusz Bednarek