

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA POLSKIEJ AKADEMII NAUK



Rozprawa doktorska

Małgorzata Grudzień

Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna nowej psiej linii komórkowej typu NK

Phenotypic and functional characteristics of the new canine NK-type cell line

Rozprawa doktorska napisana pod kierunkiem

Dr hab. Andrzeja Rapaka

Praca zrealizowana w Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów

WROCLAW 2020

Pragnę złożyć podziękowania:

Panu Promotorowi dr hab. Andrzejowi Rapakowi za możliwość podjęcia niniejszego projektu oraz pomoc i sugestie podczas jego realizacji,

Panom prof. Leonowi Strządale oraz dr hab. Wojciechowi Kałasowi za merytoryczne uwagi, inspiracje i dyskusje,

Pani mgr Ewie Ziolo za wyprowadzenie linii CNK-89 oraz nieocenioną pomoc w hodowlach komórkowych i wyrozumiałość,

Panu dr Wojciechowi Hildebrandowi za umożliwienie pobrania materiału pierwotnego, z którego została ustanowiona linia CNK-89 oraz Pani dr hab. Aleksandrze Pawlak za wykonanie badań wstępnych i wskazówki dotyczące dalszych badań,

Paniom prof. Claudine Kieda i dr Catherine Grillon za współpracę dotyczącą psiej linii komórek śródbłonna CBIMEC,

Pani dr inż. Aleksandrze Bielawskiej-Pohl za wskazówki dotyczące pracy z komórkami śródbłonna,

Paniom dr hab. Joannie Rossowskiej oraz dr inż. Natalii Anger-Górze za pomoc przy obsłudze cytometrów przepływowych oraz umożliwienie pracy na linii komórek ludzkich NK-92,

Paniom dr hab. Małgorzacie Cebrat, dr Agnieszce Łaszkiwicz oraz dr Joannie Niedbalskiej-Tarnowskiej za pomoc przy optymalizacji reakcji PCR,

Pani dr inż. Urszuli Kozłowskiej za pomoc w obsłudze mikroskopów,

Koleżankom z laboratorium w składzie: dr inż. Edyta Wysokińska, dr inż. Alicja Pawlak, dr inż. Justyna Kutkowska, dr inż. Beata Filip-Psurska, dr Anna Fiedorowicz, dr inż. Aleksandra Kaczorowska za miłą atmosferę, wsparcie merytoryczne oraz dyskusje,

Koleżankom i Kolegom ze Studium Doktoranckiego za przyjazne, motywujące rozmowy,

Pawłowi, za wsparcie, motywację i pociechę, Rodzicom i Babci za wiarę w moje możliwości i zrozumienie, Justynie za humor i porady.

Finansowanie

1. Projekt badawczy NCN nr **2011/03/B/NZ5/01533** pt.: „Skojarzona indukcja śmierci komórek psich białaczek i chłoniaków”.

Wykonawca: Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

Kierownik projektu: dr hab. Andrzej Rapak

Termin realizacji: 22.08.2012-21.08.2015

2. Projekt grantowy NCBiR/NCN *TANGO2* nr **Tango2/340428/NCBR/2017**

Termin realizacji: 01.03.2017-28.02.2020

Tytuł: „Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w diagnostyce i celowanej terapii przeciwnowotworowej psich białaczek i chłoniaków”.

Kierownik grantu: dr hab. Andrzej Rapak

Projekt realizowany w ramach konsorcjum przez Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN (lider), VetPlanet Łomianki

Prace związane z niniejszą rozprawą

Grudzien, M. & Rapak, A. Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation. J. Immunol. Res. 2018, 1–11 (2018), doi.org/10.1155/2018/4868417 (praca przeglądowa)

Grudzień, M., Pawlak, A., Kutkowska, J., Ziolo, E., Wysokińska, E., Hildebrand, W., Obmińska-Mrukowicz, B., Strządała, L., Rapak, A. A newly established canine NK-type cell line and its cytotoxic properties (w trakcie recenzji, wysłano do Vet Comp Oncol)

Komunikaty zjazdowe związane z niniejszą rozprawą

Prezentacje ustne:

5th International Conference of Cell Biology, Kraków 2019
Cytotoxic properties of a novel canine NK cell line

IV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej „Biologia-Medycyna-Terapia”, Szczawnica 2019
Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna nowej psiej linii komórkowej typu NK

Prezentacje w formie posteru:

VI Wrocławska Konferencja Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych PUZZEL, Wrocław 2017
Charakterystyka i ocena cytotoksyczności psich komórek NK

Spis treści

Streszczenie	7
Summary	8
Wykaz skrótów	9
1. Wprowadzenie	12
1.1. Pies jako model w badaniach nad immunoterapiami przeciwnowotworowymi	12
1.2. Znaczenie komórek NK w układzie odpornościowym	12
1.3. Cząsteczki powierzchniowe komórek NK	14
1.4. Efekt cytotoksyczny komórek NK	17
1.5. Interakcje komórek NK z komórkami śródbłonna	19
1.6. Źródła komórek NK	21
1.7. Wpływ wybranych interleukin na aktywność komórek NK	22
1.8. Podejścia terapeutyczne z wykorzystaniem komórek NK	22
1.9. Immunoterapie u psów – wyzwania	24
2. Cel pracy	26
3. Materiały i metody	27
3.1. Materiały plastikowe jednorazowe	27
3.2. Linie komórkowe	27
3.3. Ustanowienie psiej linii komórkowej CNK-89	29
3.4. Izolacja psich komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (cPBMC)	30
3.5. Określenie morfologii komórek NK	30
3.6. Fenotypowanie za pomocą cytometrii przepływowej	30
3.7. Ocena poziomu transkrypcji genów za pomocą reakcji RT-PCR	31
3.7.1. Określenie fenotypu komórek CNK-89	31
3.7.2. Określenie wpływu wybranych interleukin na komórki CNK-89	32
3.7.3. Izolacja RNA w TRIzol Reagent	32
3.7.4. Izolacja RNA metodą kolumnkową	33
3.7.5. Trawienie DNazą	33
3.7.6. Ocena jakości RNA	34
3.7.7. Odwrotna transkrypcja	34
3.7.8. Właściwa reakcja PCR	35
3.8. Test cytotoksyczności bezpośredniej	38
3.8.1. Barwienie komórek barwnikiem CellTrace Far Red (bCT)	38
3.8.2. Przeprowadzenie testu	38
3.8.3. Rodzaje przeprowadzonych testów cytotoksyczności bezpośredniej	39
3.9. Pomiar cytotoksyczności medium z komórek CNK-89	40
3.10. Pomiar poziomu wydzielanego IFN γ	41
3.11. Pomiar poziomu wydzielanego TNF α	41

3.12.	Analiza statystyczna	42
4.	Wyniki	43
4.1.	Ustanowienie linii komórkowej CNK-89	43
4.2.	Analiza fenotypowa i morfologiczna komórek CNK-89	44
4.2.1.	Analiza fenotypowa komórek CNK-89 za pomocą cytometrii przepływowej	44
4.2.2.	Analiza wybranych transkryptów komórek CNK-89 za pomocą reakcji RT-PCR	46
4.2.3.	Morfologia komórek CNK-89	47
4.3.	Bezpośrednie właściwości cytotoksyczne komórek CNK-89	48
4.3.1.	Opracowanie metody badania bezpośredniej cytotoksyczności	48
4.3.2.	Ocena wrażliwości psich komórek nowotworowych typu B na cytotoksyczność ludzkich komórek NK-92 po 4 godzinach	51
4.3.3.	Ocena wrażliwości psich komórek nowotworowych typu B na cytotoksyczność psich komórek PBMC (cPBMC) po 4 godzinach	53
4.3.4.	Ocena cytotoksyczności komórek CNK-89 względem psich komórek nowotworowych typu B po 4 godzinach	55
4.3.5.	Ocena cytotoksyczności komórek CNK-89 względem psich komórek nowotworowych typu B po 24 godzinach	57
4.3.6.	Ocena cytotoksyczności komórek CNK-89 względem komórek psiego śródbłónka po 4 godzinach	59
4.3.7.	Ocena cytotoksyczności komórek CNK-89 względem komórek psiego śródbłónka po 24 godzinach	60
4.4.	Wpływ interleukin na właściwości cytotoksyczne komórek CNK-89	60
4.4.1.	Stymulacja komórek CNK-89 interleukinami – oznaczenie wydzielania cytokin	60
4.4.2.	Stymulacja komórek CNK-89 interleukinami – oznaczenie PCR	62
4.4.3.	Stymulacja komórek CNK-89 interleukinami – ocena cytotoksyczności medium	63
4.4.4.	Stymulacja komórek CNK-89 interleukinami – wpływ na cytotoksyczność bezpośrednią CNK-89	66
4.4.5.	Długoterminowy wpływ interleukin na cytotoksyczność CNK-89	71
5.	Dyskusja	74
6.	Wnioski	84
7.	Piśmiennictwo	85
8.	Wykaz rycin i tabel	95

Streszczenie

Pies, jako organizm modelowy dobrze uzupełnia lukę pomiędzy badaniami prowadzonymi na myszach, a eksperymentami wykorzystującymi udział pacjentów, głównie ze względu na fakt podobieństwa rozwoju i przebiegu chorób nowotworowych. Linie komórkowe, często powstałe z pierwotnych komórek nowotworowych, są wygodnym narzędziem do szybkiego i wydajnego wstępnego testowania nowych podejść terapeutycznych. Obecnie dostępnych jest wiele psich linii komórek nowotworowych, w tym kilka wywodzących się z chłoniaków i białaczek typu B oraz T, jednak do tej pory nie scharakteryzowano psiej linii komórkowej o właściwościach limfocytów natural killer (NK). Komórki tego typu zabijają komórki nowotworowe oraz zainfekowane wirusem bez konieczności uprzedniej immunizacji, co w ostatnich latach jest wykorzystywane przy projektowaniu podejść terapeutycznych z dziedziny immunoterapii. Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie pod kątem fenotypowym oraz funkcjonalnym nowej linii komórkowej wywodzącej się z psiego nowotworu, która w wyniku badań wstępnych wykazała cechy komórek typu NK.

Badania wchodzące w skład niniejszej rozprawy dowiodły, iż nowa linia komórkowa CNK-89 wykazuje fenotyp komórek NK: obecność białek CD5, CD8, CD45, CD56, NKp46 oraz CD79a a także transkryptów genów CD56, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 oraz perforyny. W testach funkcjonalnych komórki CNK-89 wykazały cytotoksyczność względem psich linii komórkowych wywodzących się z białaczek/chłoniaków typu B. Stymulacja komórek CNK-89 interleukinami IL-12 oraz IL-18 przez 48 godz. zwiększała ich właściwości cytotoksyczne, a efekt ten utrzymywał się do 7 dni od usunięcia interleukin z układu doświadczalnego.

Przeprowadzona charakterystyka komórek CNK-89 może przyczynić się do rozwoju badań nad immunoterapiami skierowanymi do psów, co z kolei może zaowocować opracowaniem skutecznych terapii dla nowotworów ludzkich.

Summary

By being a model organism, dog fills the gap between the research conducted on mice and on patients very well due to the similarities of the development and course of cancer. Cell lines established from the primary cancer cells are a convenient tool for the fast and efficient screenings of new therapeutic approaches. Currently, many canine cancer cell lines are available, including those arising from type B and type T leukemias and lymphomas, however up to date no canine natural killer (NK) cell line was characterized. NK cells can kill cancer and viral-infected cells without prior immunization which is recently used for designing immunotherapeutic approaches. The aim of this project was to characterize phenotypically and functionally new cell line arising from a canine cancer which was initially evaluated as a NK-type.

Experiments included in this thesis proved that a new cell line CNK-89 displays the phenotype of NK cells: the presence of CD5, CD8, CD45, CD56, NKp46 and CD79a proteins as well as the transcripts for CD56, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 and perforin genes. Functionally, CNK-89 cells showed cytotoxicity against canine B-type leukemia/lymphoma cells. Priming of CNK-89 cells with interleukins IL-12 and IL-18 for 48 hours increased their cytotoxic properties and this effect was still visible after 7 days from interleukins removal.

The characteristics of CNK-89 cells performed in this project can contribute to the development of the research focused on canine immunotherapies which in turn may be beneficial to the therapies for human cancers.

Wykaz skrótów

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>	cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
ASH	<i>American Society of Hematology</i>	Amerykańskie Stowarzyszenie Hematologów
BCR	<i>B-cell receptor</i>	receptor limfocytu B
bCT	<i>Cell Trace</i>	barwnik Cell Trace
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>	chimeryczny receptor antygenowy
CD	<i>cluster of differentiation</i>	antygen różnicowania komórkowego
cPBMC	<i>canine peripheral blood mononuclear cells</i>	psie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
DNAM1	<i>DNAX accessory molecule 1</i>	cząsteczka pomocnicza DNAX 1
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	kwask wersenowy
FASL	<i>FS-7-associated surface antigen ligand</i>	ligand dla antygeny zasocjowanego z FS-7
FCS	<i>fetal calf serum</i>	cielęca surowica płodowa
FITC	<i>fluorescein</i>	fluoresceina
HE	<i>hematoxylin-eosin</i>	hematoksylina-eozyna
IFNγ	<i>interferon gamma</i>	interferon gamma
IgG	<i>immunoglobulin G</i>	immunoglobulina G
IL	<i>interleukin</i>	interleukina
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin-like receptors</i>	immunoglobulinopodobne receptory komórek zabijających

KLRG1	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>	lektynopodobny receptor komórek zabójców 1 z podrodziny G
LAG3	<i>lymphocyte activation gene 3</i>	gen aktywacji limfocytów 3
LAK	<i>lymphokine-activated killer cells</i>	komórki-zabójcy aktywowane limfokinami
LGL	<i>large granular lymphocytes</i>	duże ziarniste limfocyty
LY49	<i>lymphocyte antigen 49</i>	antygen limfocytowy 49
MGG	<i>May-Grünwald-Giemsa</i>	Barwnik Maya-Grünwalda-Giemsy
MHC I	<i>major histocompatibility complex class I</i>	główny układ zgodności tkankowej klasy I
N-CAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>	nerwowa cząsteczka adhezyjna
NK	<i>natural killers</i>	naturalni zabójcy
NKG2D	<i>natural killer group 2</i>	grupa 2 komórek NK
NKp30	<i>natural killer cell p30-related</i>	białko spokrewnione z p46 komórki NK
NKp44	<i>natural killer cell p44-related</i>	białko spokrewnione z p44 komórki NK
NKp46	<i>natural killer cell p46-related</i>	białko spokrewnione z p30 komórki NK
NKT	<i>natural killer T cells</i>	komórki T o właściwościach naturalnych zabójców
NT	<i>non-treated</i>	nietraktowane
PChO	-	Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>	receptor programowanej śmierci 1
PE	<i>phycoerythrin</i>	fikoerytryna

PI	<i>propidium iodide</i>	jodek propidyny
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>	łańcuchowa reakcja polimerazy na materiale poddanym odwrotnej transkrypcji
TAE	<i>Tris – acetate – EDTA buffer</i>	Bufor Tris – octan - EDTA
TCR	<i>T-cell receptor</i>	receptor limfocyту T
TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>	immunoreceptor komórek T z domenami Ig oraz ITIM
TIM3	<i>T cell immunoglobulin domain and mucin domain 3</i>	domena immunoglobulionowa i mucynowa limfocyту T 3
TNF	<i>tumor necrosis factor a</i>	czynnik martwicy nowotworu
TP	-	temperatura pokojowa
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>	ligand indukujący apoptozę związany z TNF

1. Wprowadzenie

1.1. Pies jako model w badaniach nad immunoterapiami przeciwnowotworowymi

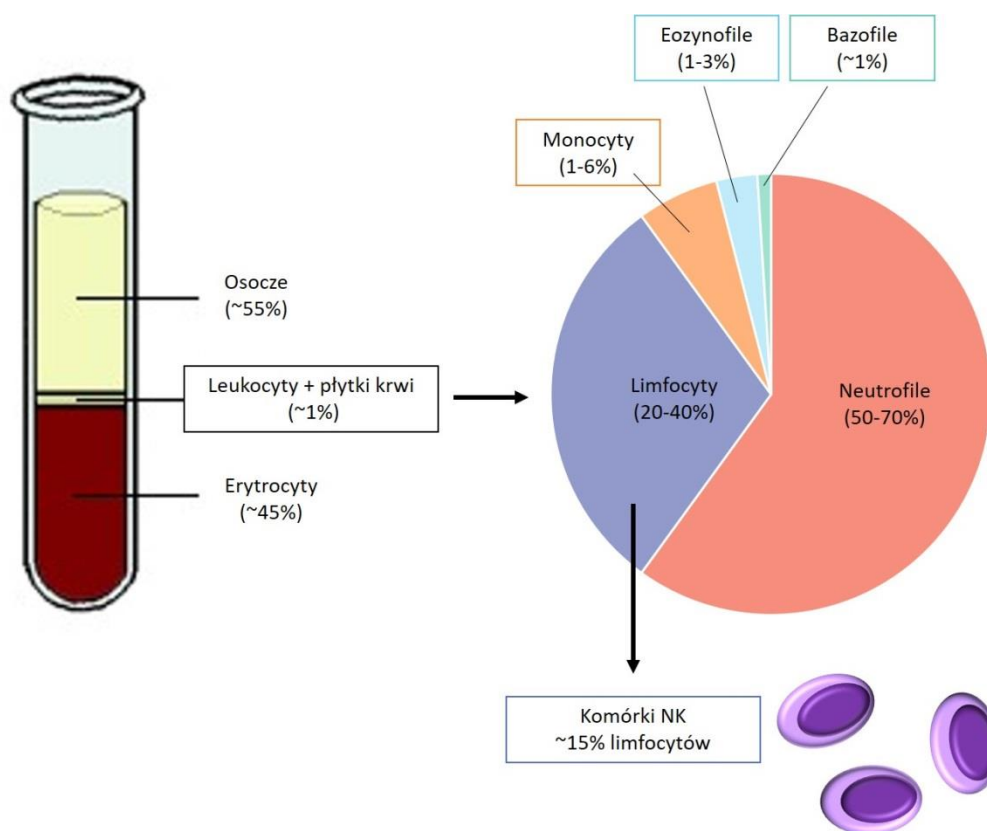
Pies, jako towarzysz życia człowieka, narażony jest na szkodliwe działanie czynników środowiskowych w stopniu porównywalnym do ludzi. Psie nowotwory, podobnie jak ludzkie, zapoczątkowane są spontanicznie wskutek niesprawnie działającego układu odpornościowego¹. Ponadto, część nowotworów psich (między innymi chłoniaki i białaczki) wykazuje duże podobieństwo w przebiegu oraz odpowiedzi na terapię z ich odpowiednikami występującymi u ludzi. Dla porównania, model myszy – choć w wielu typach badań potrzebny i mający wiele zalet, w przypadku badań nad immunoterapiami ma swoje ograniczenia, między innymi wynikające z faktu braku występowania natywnego środowiska nowotworu, które, jak udowodniono, odgrywa dużą rolę w progresji choroby². Dodatkowo, ograniczona zmienność genetyczna w obrębie danej rasy, analogie anatomiczne i fizjologiczne, relatywnie niewielki rozmiar oraz długość życia czynią psa odpowiednim modelem do badań toksykologicznych³. Badania na komórkach psich wydają się zatem dobrym uzupełnieniem do testów przeprowadzanych na komórkach mysich oraz ludzkich. Łatwy dostęp do opieki weterynaryjnej oraz rozwój badań w tej dziedzinie umożliwiają właścicielom psów zapewnienie choremu zwierzęciu coraz lepszej pomocy, a naukowcom materiał badawczy, między innymi komórki nowotworowe, z których wyprowadzone mogą zostać linie komórkowe. Linie takie są wygodnym narzędziem badawczym pozwalającym na wstępne testowanie skuteczności leków przeciwnowotworowych, a do ich zalet należą niskie koszty hodowli, powtarzalność wyników oraz możliwość testowania znacznie większej liczby zmiennych w przeciwieństwie do ograniczonej ilości materiału pierwotnego. Obecnie dostępnych jest kilka psich linii chłoniaków i białaczek powstałych z komórek typu B (np. GL-1⁴, CLBL-1⁵) oraz typu T (np. CL-1⁶), brakuje natomiast linii wywodzącej się z komórek typu NK.

1.2. Znaczenie komórek NK w układzie odpornościowym

Układ odpornościowy to system obronny organizmu umożliwiający ochronę przed rozwojem choroby. Jest to możliwe dzięki rozpoznaniu i eliminacji patogenów (np. wirusów) oraz komórek nowotworowych. Wyróżnia się dwie części układu odpornościowego: odpowiedź wrodzoną, która jest natychmiastowa i nieswoista oraz

odpowieź nabytą, która jest swoista, jednak jej wykształcenie wymaga uprzedniego kontaktu z czynnikiem infekcyjnym. Jednym z elementów układu odpornościowego są krwinki białe – leukocyty, których zawartość we krwi obwodowej wynosi około 1%. Termin leukocyty obejmuje następujące typy komórek: granulocyty obojętnochłonne (neutrofile; 50 – 70 % leukocytów), limfocyty (około 20 – 40 % leukocytów), monocyty (około 1 – 6% leukocytów), granulocyty kwasochłonne (eozynofile; około 1 – 3% leukocytów) oraz granulocyty zasadochłonne (bazofile; około 1% leukocytów)⁷. Wśród limfocytów wyróżnia się komórki typu T, B oraz NK (natural killers). Frakcja komórek typu NK obejmuje około 5-15% limfocytów i funkcjonuje jako część odpowiedzi wrodzonej, eliminując komórki nowotworowe oraz zainfekowane wirusem bez konieczności uprzedniej immunizacji⁸. Oprócz podstawowej funkcji – spontanicznego zabijania komórek docelowych – uczestniczą także w procesach immunoregulacyjnych.

Poza krwią obwodową, komórki typu NK występują także w szpiku kostnym, wątrobie, macicy, śledzionie, płucach, grasicy oraz obwodowych narządach limfatycznych⁹. Dane procentowe dotyczące składu krwi ludzkiej⁷ oraz psiej¹⁰, ze względu na ich znaczne podobieństwo, zilustrowane zostały na Ryc. 1.



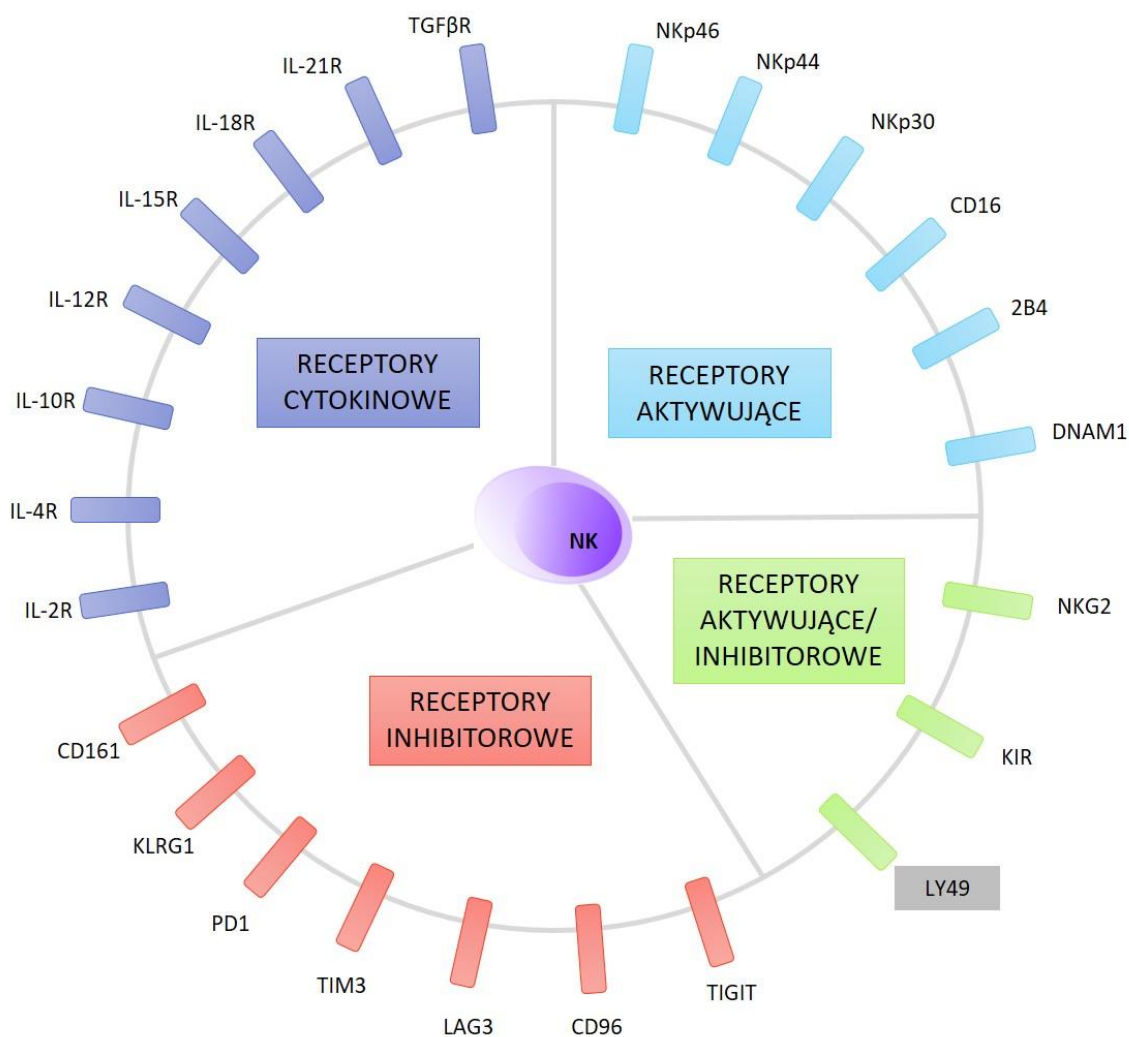
Ryc. 1 Procentowy skład elementów krwi ludzkiej oraz psiej, z uwzględnieniem zawartości procentowej populacji komórek NK.

1.3. Cząsteczki powierzchniowe komórek NK

Morfologicznie komórki NK należą do frakcji LGL (large granular lymphocytes), czyli dużych ziarnistych limfocytów¹¹. Dojrzałe komórki NK są wynikiem różnicowania się prekursorów pochodzenia szpikowego w szpiku oraz w obwodowych narządach limfatycznych¹².

Podstawowe markery występujące na powierzchni ludzkich komórek NK to cząsteczki: CD56 (cluster of differentiation), będąca izoformą cząsteczki N-CAM (neural cell adhesion molecule) oraz CD16, będąca receptorem dla fragmentu Fc przeciwciał typu IgG (immunoglobulin G). W ludzkich komórkach NK nie stwierdza się obecności markera CD3 (jest on natomiast obecny w komórkach typu NKT). Klasyczny podział komórek typu NK obejmuje dwie populacje: mniej dojrzałą, cechującą się wyższą ekspresją markera CD56 i brakiem markera CD16 o właściwościach immunoregulatorowych ($CD56^{bright} CD16^{-}$) oraz dojrzałą populację o niższej ekspresji CD56 i obecności CD16 o właściwościach cytotoksycznych ($CD56^{dim} CD16^{+}$)⁸.

Ponadto, na powierzchni komórek NK występuje także panel receptorów powierzchniowych kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania tej populacji limfocytów. Wyróżnić można receptory aktywujące, inhibitorowe, aktywujące/inhibitorowe oraz cytokinowe. Grupy receptorów wraz z ich przedstawicielami zilustrowano na Ryc. 2.



Ryc. 2 Panel receptorów zidentyfikowanych na powierzchni komórek NK. Na fioletowo zaznaczono receptory dla cytokin, na niebiesko receptory aktywujące, na czerwono receptory inhibitorowe, a na zielono receptory mogące służyć zarówno jako aktywujące, jak i inhibitorowe. Zaznaczony na szaro receptor LY49 nie został zidentyfikowany w komórkach NK ludzkich. Opracowano na podstawie¹³.

Obecnie, podstawowe kryteria do identyfikacji psich komórek NK to: fenotyp nie-B oraz nie-T, przynależność do frakcji LGL oraz cytotoksyczność względem psich komórek nowotworowych. W przeciwieństwie do komórek NK ludzkich, nie opracowano do tej pory panelu cząsteczek powierzchniowych jednoznacznie charakteryzujących populację psich komórek NK¹⁴. Poniżej zebrano doniesienia dotyczące obecności markerów komórek typu NK w przypadku psich limfocytów NK. W przypadku komórek psich NK, w przeciwieństwie do komórek NK ludzkich, obecność markerów CD56 oraz CD3 jest niejednoznaczna.

- **CD56.** mRNA dla białka CD56 zostało u psa zidentyfikowane w 2005 roku¹⁵, natomiast później opublikowano opis przypadku psa cierpiącego na białaczkę

limfatyczną o fenotypie nie-T nie-B, uznaną za nieprawidłowy rozrost komórek o fenotypie NK, między innymi z powodu wykrycia obecności mRNA dla CD56. Źródłem komórek do badań była krew obwodowa pacjenta¹⁶. Pomimo tego, scharakteryzowanych zostało kilka populacji komórek o właściwościach typowych dla limfocytów NK, jednak nie posiadających cząsteczki CD56^{14,17,18}. W 2016 roku dowiedziano występowania cząsteczki CD56 na powierzchni populacji w obrębie psich PBMC za pomocą cytometrii przepływowej, jednak białko to zidentyfikowano jedynie w populacji komórek posiadających dodatkowo białko CD3. Populacja CD56+CD3+ została sklasyfikowana przez autorów cytowanych badań jako populacja nie-NK¹⁹.

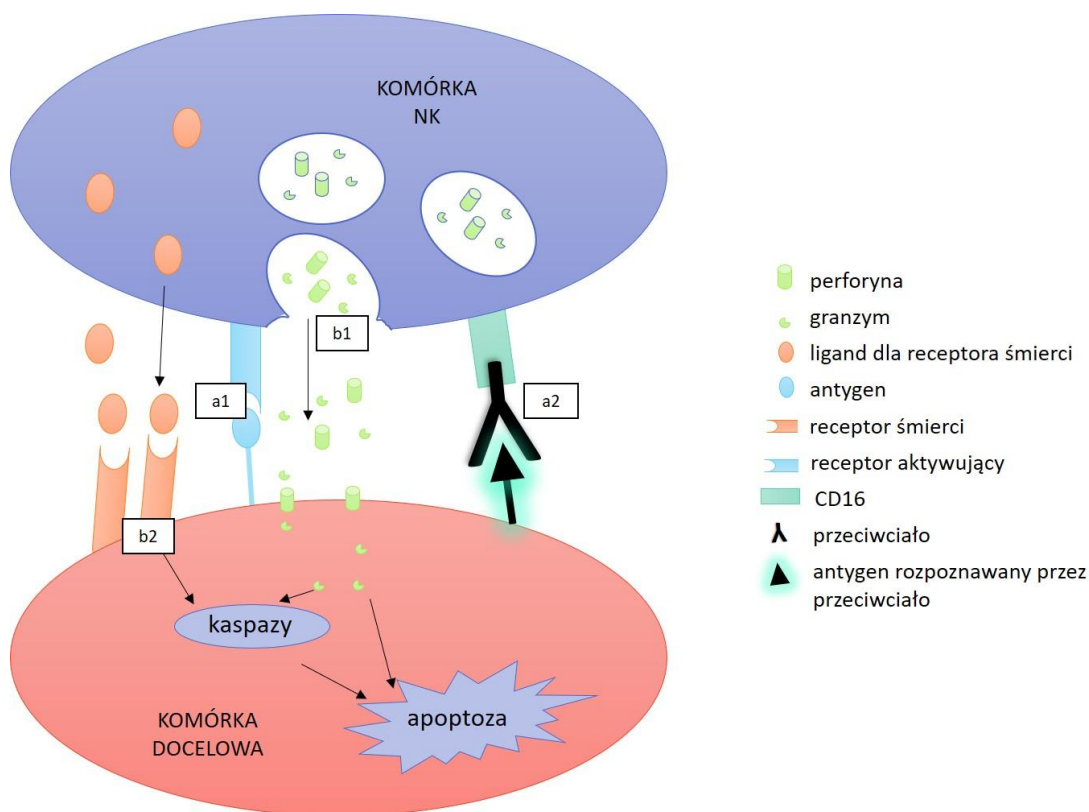
- **CD16.** CD16, ważne białko w ludzkich komórkach NK, nie zostało do tej pory zidentyfikowane na powierzchni psich komórek NK, jednak kilka grup badawczych zidentyfikowało obecność transkryptu CD16 w populacjach uznanych za komórki NK^{17,20,21}.
- **CD3.** Sprawa obecności markera CD3 w psich komórkach NK nie została jeszcze do końca wyjaśniona, aczkolwiek niektórzy badacze przyjmują populacje komórkowe CD3⁻ jako populacje psich komórek NK^{19,21,22}. Należy jednak zaznaczyć, że opisano także kilkakrotnie populacje psich komórek wykazujących właściwości funkcjonalne komórek NK o fenotypie CD3^{+14,23}. Postuluje się, że psie komórki NK mogłyby ekspresjonować CD3 na niektórych etapach różnicowania²³.
- **TCR** (T cell receptor). U ludzi receptor ten nie występuje na powierzchni komórek NK, a badania na psich komórkach potwierdzają to zjawisko dla tego gatunku, zatem przyjmuje się, że populacja psich komórek NK nie powinna zawierać izoform TCR $\alpha\beta$ ani TCR $\gamma\delta$ ^{14,23}.
- **CD5.** Zidentyfikowano populację komórek o niskiej ekspresji CD5 (CD5^{dim}), u których zaobserwowano właściwości cytotoksyczne, które ponadto wzrastały znacząco po stymulacji IL-2, oraz obecność cytoplazmatycznych granul. Komórki o wysokiej ekspresji CD5 (CD5^{bright}) miały mniejsze rozmiary i nie wykazywały znaczącego wzrostu cytotoksyczności po stymulacji IL-2¹⁷.
- **NKp46.** W psich limfocytach NK został także zidentyfikowany transkrypt markera NKp46^{14,18,24}, a także wykryto białko powierzchniowe przy użyciu przeciwciała, aczkolwiek zidentyfikowano także populację komórek pozbawionych NKp46 o właściwościach komórek NK²¹.

- **CD94.** Kolejnym markerem używanym w badaniach nad psimi komórkami NK jest cząsteczka CD94, początkowo zidentyfikowana poprzez obecność mRNA¹⁷, a następnie także poprzez wykrycie białka za pomocą przeciwciała²⁵.
- **NKG2D.** Marker NKG2D, zidentyfikowany u ludzi oraz myszy, nie został zidentyfikowany jako receptor powierzchniowy na psich komórkach NK, jednak oznaczono poziom jego mRNA^{14,17}.
- **CD4.** W psich komórkach NK nie stwierdza się obecności markera CD4 (marker fenotypowy dla komórek typu T)^{16,26,27}.
- **CD21.** W psich komórkach NK nie stwierdza się obecności markera CD21 (marker fenotypowy komórek typu B)^{16,26,27}.
- **CD8.** W psich komórkach typu NK identyfikuje się obecność cząsteczki CD8^{19,28,29}.
- **NKp30.** W psich komórkach NK identyfikuje się obecność markera NKp30^{21,29}.
- **NKp44.** W psich komórkach NK identyfikuje się obecność markera NKp44^{21,29}.
- **Perforyna.** W psich komórkach NK stwierdza się obecność perforyny^{21,30}.
- **Granzym B.** W psich komórkach NK stwierdza się obecność granzymu B^{21,30}.

1.4. Efekt cytotoksyczny komórek NK

Do komórek NK docierają ze środowiska zarówno sygnały odbierane przez receptory aktywujące, jak i przez białka inhibitorowe. Receptory inhibitorowe zapobiegają zabijaniu przez komórki NK komórek posiadających kompleks białek MHC I (major histocompatibility complex class I). Zmniejszenie ekspresji MHC I jest jednym z mechanizmów ucieczki komórek nowotworowych oraz zainfekowanych wirusem przez rozpoznanie i zabicie przez komórki efektorowe. W momencie, gdy występuje przewaga sygnałów aktywujących lub niedostatek sygnałów inhibitorowych, rozpoczyna się aktywacja komórek NK, czyli wzrasta ich cytotoksyczność (Ryc. 3 – szlak sygnałowy a1³¹). Następnym stymulacji komórek NK są dwa mechanizmy ich działania. Podstawowym efektem występującym w tych komórkach jest wzmożona produkcja i sekrecja granul zawierających głównie perforynę i granzymy. Podczas egzocytozy błona granul łączy się z błoną komórki NK, uwalniając przy tym zawartość pęcherzyka do przestrzeni międzykomórkowej. Następnie perforyna tworzy pory w błonie komórki docelowej. Do komórki tej wnikają także granzymy, które rozpoczynają w niej proces apoptozy, zarówno poprzez ścieżkę zależną od kaspaz, jak i niezależną (Ryc. 3 – b1). Drugi

typ reakcji cytotoksycznej obejmuje działanie receptorów śmierci (Ryc. 3 – b2). W komórkach NK zidentyfikowano ligandy dla tych receptorów: wydzielany TNF α (tumor necrosis factor α) oraz FASL (FS-7-associated surface antigen ligand) i TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Ekspresja tych ligandów regulowana jest za pomocą IFN γ (interferon γ). W momencie połączenia ligandu zlokalizowanego na komórce NK z jego receptorem na komórce docelowej dochodzi do aktywacji ścieżki apoptozy zależnej od kaspazy, a w efekcie do śmierci komórki docelowej³². Ponadto wydzielane przez komórki NK TNF α oraz IFN γ uczestniczą w komunikacji komórek NK z innymi komórkami układu odpornościowego. Szczególnym rodzajem aktywacji komórek NK jest ADCC, czyli cytotoksyczność zależna od przeciwciał. W reakcji tego typu przeciwciało rozpoznające specyficzny antygen zlokalizowany na komórce docelowej przyłącza się swoim fragmentem Fc do receptora CD16 znajdującego się na komórce NK, co aktywuje odpowiedź cytotoksyczną komórki efektorowej (Ryc. 3 - a2).



Ryc. 3 Mechanizmy aktywacji komórki NK (szlak a1 oraz a2) oraz rodzaje odpowiedzi cytotoksycznej względem komórek docelowych (szlak b1 oraz b2). Niniejsza rycina jest zmodyfikowaną ryciną z własnej publikacji³³.

Do mierzenia poziomu bezpośredniej cytotoksyczności komórek typu NK konieczne jest zastosowanie komórek docelowych (zwykle nowotworowych) wrażliwych na zabijanie przez te limfocyty. W przypadku ludzkich komórek taką linią referencyjną jest

linia komórek białaczkowych K562, używana powszechnie w testach cytotoksyczności³⁴⁻³⁶. W badaniach na psich komórkach NK najczęściej jako linii docelowej używano komórek CTAC³⁷.

Oprócz komórek CTAC jako docelowych, w kilku badaniach użyto komórek CL-1, które także okazały się wrażliwe na zabijanie przez psie komórki NK^{38,39}. Linie wykorzystywane do badań cytotoksyczności psich komórek NK zostały przedstawione w Tab. 1. Do tej pory jednak nie opublikowano badań używających jako docelowych komórek materiału o fenotypie komórek typu B.

Tab. 1 Zestawienie psich linii komórkowych używanych w testach cytotoksyczności wykorzystujących psie komórki typu NK

nazwa linii	liczba prac	typ komórek	źródło
BW KOS	1	komórki psiego kostniakomięsaka	40
CF41	1	komórki psiego nowotworu gruczołu sutkowego	40
CF41.Mg	1	komórki psiego nowotworu gruczołu sutkowego	14
CL-1	5	komórki psiego chłoniaka T-komórkowego	38,39,41-43
CT-45S	2	komórki psiego chłoniaka T-komórkowego	44,45
CTAC	29	komórki psiego gruczolakoraka tarczycy	14,17,19-21,24,25,28,30,40,44-61
DH82	1	komórki psiej histiocytozy	40
Gray	1	komórki psiego kostniakomięsaka	21
K1	1	komórki psiego nowotworu wargi	57
K6	1	komórki psiego nowotworu wargi	57
K9TCC-pv-AXC	1	komórki psiego nowotworu nabłonka przejściowego	14
MDCK	1	komórki psiej nerki	49
OSCA-32	1	komórki psiego kostniakomięsaka	24
OSCA40	1	komórki psiego kostniakomięsaka	21
OSCA-78	1	komórki psiego kostniakomięsaka	24
OSCA8	1	komórki psiego kostniakomięsaka	21

Opracowano na podstawie własnych studiów literaturowych. W tabeli nie uwzględniono badań z wykorzystaniem metody ADCC.

1.5. Interakcje komórek NK z komórkami śródbłonka

Komórki śródbłonka tworzą wyściółkę naczyń krwionośnych i limfatycznych. Wyściółka ta zbudowana jest z pojedynczej warstwy komórek i znajduje się po wewnętrznej stronie naczyń, formując barierę pomiędzy krwią lub limfą oraz wnętrzem tkanek. Obecność panelu receptorów oraz ligandów związanych z adhezją komórek na

powierzchni śródbłonna umożliwia proces migracji leukocytów (w tym także komórek NK) przez ową barierę komórkową.

Interakcje pomiędzy ludzkim śródbłonkiem, a komórkami NK są w niewielkim stopniu opisane w literaturze, natomiast nie ma do tej pory opublikowanych badań skupiających się na wzajemnym oddziaływaniu tych komórek w przypadku modelu psiego. Ważnym aspektem badań nad skutkami ubocznymi terapii wykorzystującej IL-2 była identyfikacja mechanizmu odpowiadającego za zagrażające życiu pacjentów skutki uboczne. Odkryto, że zbyt duże dawki IL-2 doprowadzały do przeciekania naczyń krwionośnych, co związane było ze zniszczeniem komórek śródbłonna⁶². IL-2 wywoływała nadmierną aktywację komórek NK, przez co zabijały one nie tylko komórki niebezpieczne dla organizmu, ale także i neutralny śródbłonek⁶³. Mając na uwadze te niepożądane efekty konieczna jest ocena cytotoksyczności aktywowanych komórek NK wykorzystywanych w celach terapeutycznych także względem komórek niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, między innymi komórki śródbłonna.

1.6. Źródła komórek NK

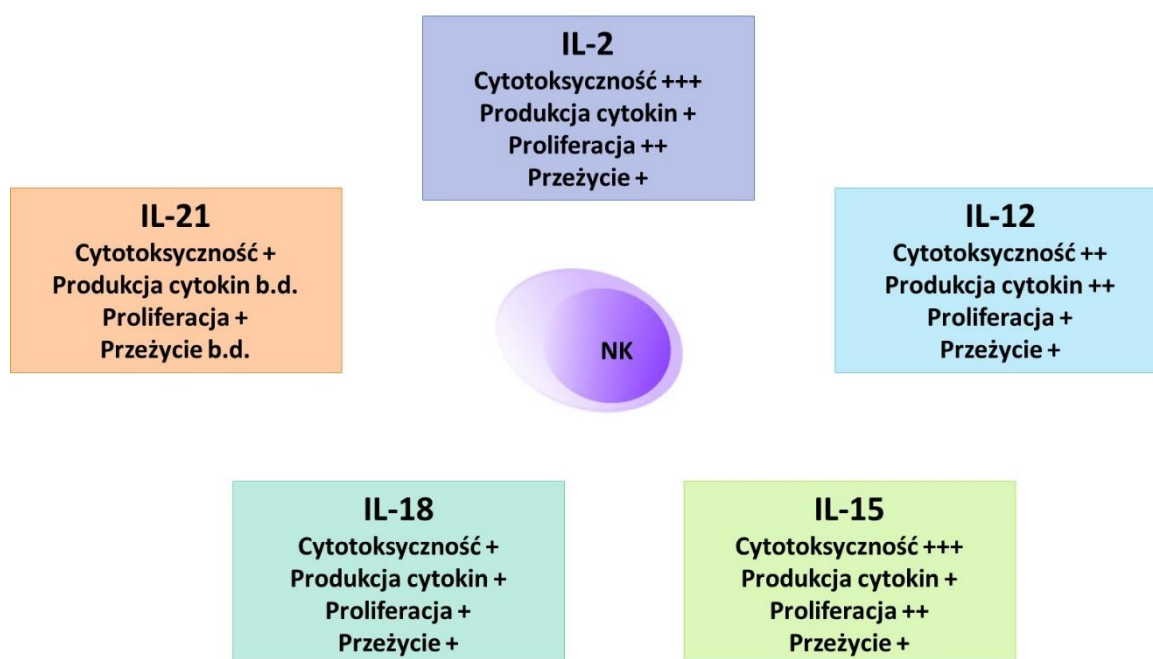
Wśród źródeł komórek NK wykorzystywanych do leczenia ludzi dużą rolę pełnią komórki NK izolowane z krwi obwodowej oraz linia NK-92, na bazie której powstały modyfikowane genetycznie podlinie⁶⁴. Z powodu braku dostępności psiej linii komórkowej typu NK, dotychczasowe badania dotyczące tych komórek zostały wykonane przy użyciu materiału pierwotnego pobranego bezpośrednio od zwierząt. Powszechnie używanym źródłem tych komórek jest krew obwodowa, z której izolowano frakcję PBMC, najczęściej przy użyciu wirowania w gradiencie ficollu. Następnie z frakcji PBMC wyodrębniano populacje komórek o pożądanym cechach, mając na uwadze dostarczenie komórek NK w hodowli bodźców wzmagających ich przeżycie, proliferację oraz aktywację (ekspansja *ex vivo*). W przypadku psich komórek NK i braku ustanowionych markerów jednoznacznie identyfikujących tę populację, stosowane były następujące podejścia:

- Inkubacja z cytokinami – do hodowli PBMC dodawano interleukiny, rekombinowane ludzkie (IL-2, IL-12, IL-15)^{14,19,45,47} lub rekombinowane psie (IL-2, IL-15, IL-21)^{21,28,46}, z zamiarem wywołania aktywacji i zwiększenia proliferacji komórek NK, a w efekcie czego ich liczby, w celu uzyskania bardziej homogenicznej populacji.
- Hodowle mieszane („co-cultures”) z komórkami podtrzymującymi – hodowla komórek PBMC z komórkami wrażliwymi na zabijanie przez komórki NK także wspomaga proces aktywacji i proliferacji komórek NK. Jako komórki podtrzymujące, w badaniach wykorzystywano ludzką linię białaczkową K562⁶⁵, uprzednio napromieniowaną²¹.
- Separacja immunomagnetyczna – ten sposób wykorzystywano zwykle do wyodrębnienia z frakcji PMBC komórek przeszkadzających w dalszych badaniach, np. limfocytów T. W 2013 roku opisano podejście, w którym usunięto z hodowli komórki CD5⁺⁴⁷.

W celu uzyskania populacji o jak największej czystości do dalszych badań, stosowano zwykle kombinacje powyższych podejść. Oprócz krwi obwodowej, opisano także w literaturze izolacje psich komórek NK ze szpiku kostnego^{48,55}.

1.7. Wpływ wybranych interleukin na aktywność komórek NK

Interleukiny należą do grupy cytokin – cząsteczek regulujących rozmaite procesy komórkowe, jak proliferacja, różnicowanie czy aktywność cytotoksyczna. Interakcje interleukin z komórkami możliwe są dzięki obecności receptorów transbłonowych rozpoznających cytokiny, zlokalizowanych na komórkach (Ryc. 2). Badania dowodzą, że kluczowy wpływ na rozwój i funkcjonowanie komórek NK mają IL-2 oraz IL-15, aczkolwiek IL-12, IL-18 oraz IL-21 także zostały zidentyfikowane jako cząsteczki o działaniu aktywującym. Wpływ interleukin: 2, 12, 15, 18 oraz 21 na komórki NK zilustrowano na Ryc. 4.



Ryc. 4 Wpływ poszczególnych interleukin na właściwości komórek NK. Liczba + oznacza moc wywieranego efektu (+++ - najsilniejszy efekt). Skrót b.d. oznacza brak danych. Opracowano na podstawie⁶⁶.

Eksperymenty z wykorzystaniem interleukin wykonane na modelu psim stanowią niewielki procent ogółu badań przeprowadzonych z użyciem tych cytokin. Część spośród tych badań opisywała skuteczne podejścia lecznicze za pomocą terapii genowych wykorzystujących geny IL-2⁶⁷ oraz IL-12⁶⁸, czy też stosując kombinacje IL-15 z IL-6⁶⁹.

1.8. Podejścia terapeutyczne z wykorzystaniem komórek NK

Immunoterapie wykorzystujące właściwości komórek NK wydają się obiecujące z kilku powodów. Po pierwsze, liza komórek nowotworowych przez komórki NK nie

wymaga ich wcześniejszej ekspozycji na czynniki efektorowe, zatem reakcja może być zapoczątkowana bez wcześniejszej adaptacji komórek NK. Ponadto, dzięki identyfikacji komórek o obniżonej ekspresji MHC I (hipoteza „missing self”), efekторы NK są w stanie zidentyfikować jako szkodliwe te komórki, które nie będą rozpoznawane przez inne limfocyty. Badania dowiodły także, że u wielu pacjentów z chorobami nowotworowymi aktywność komórek NK była znacznie obniżona – co doprowadziło do rozwinięcia się choroby, przez co właściwym podejściem wydaje się przywrócenie prawidłowego funkcjonowania tych limfocytów w celu skuteczniejszej likwidacji stanu patologicznego⁷⁰. Co ważne, biologia komórek typu NK pozwala na zastosowanie wielu różnych strategii terapeutycznych. Zasadniczo, przywrócenie prawidłowego funkcjonowania komórek NK może odbywać się na dwa sposoby: poprzez zwiększenie liczby/aktywności czynników aktywujących komórki NK lub w wyniku obniżenia liczby/aktywności czynników inhibitorowych. Aby otrzymać populację komórek NK o pożądanym cechach, komórki poddaje się często ekspansji – przy użyciu komórek podtrzymujących (feeder cells) czy cytokin. Limfocyty NK można także poddawać modyfikacjom genetycznym polegającym zwykle na:

- zwiększeniu ekspresji receptorów aktywujących na powierzchni komórek NK
- zmniejszeniu ekspresji receptorów inhibitorowych na powierzchni komórek NK
- stworzeniu chimerycznego receptora antygenowego (CAR)
- zwiększeniu ekspresji receptora CD16, niezbędnego w reakcji ADCC

Ponadto istnieją także terapie wykorzystujące przeciwciała monoklonalne (reakcja ADCC), przeciwciała bi- lub tri-specyficzne, leki immunomodulujące, które zwiększają ekspresję ligandów dla receptorów śmierci w komórkach NK czy blokowanie receptorów typu checkpoint na komórkach NK (np. PD-1)⁷⁰.

Analogicznie do badań fenotypowych, badania z wykorzystaniem psich komórek NK w ujęciu klinicznym prowadzone były na bazie materiału poddanego ekspansji *ex vivo*. Funk ze współpracownikami podjęli się analizy cytotoksyczności komórek NK izolowanych z krwi psów cierpiących na nowotwory. Badanie z 2003 roku wykazało, że cytotoksyczność komórek typu NK wyizolowanych od psów z nowotworami była niższa w porównaniu do komórek grupy kontrolnej. Komórki chorych psów wykazywały także niższy poziom proliferacji limfocytów indukowanej mitogenami⁵². Kolejna praca tego zespołu podjęła się analizy funkcjonalnej komórek NK oraz LAK (lymphokine-activated killer cells) pobranych od psów zdrowych oraz wykazujących spontaniczne nowotwory.

Stymulacja IL-2 skutkowała wzrostem cytotoksyczności komórek, zarówno w grupie pacjentów, jak i zdrowych psów, ze wskazaniem na większy wzrost w grupie zdrowej, co świadczy o istnieniu defektu komórek NK w grupie pacjentów⁵³. Wśród badań dotyczących wpływu interleukin na psie komórki wyróżnia się praca z 2015 opisująca wpływ ludzkiej IL-12 na psy z czerniakiem. Badanie to dowiodło, że IL-12 jest dla psów bezpieczna, a ponadto wykazała kliniczną aktywność⁷¹. Postępy w tworzeniu rekombinowanych psich interleukin (np. IL-15²⁸) oraz psich przeciwciał dla receptorów komórek NK (np. NKp46²¹) mogą w najbliższych latach przynieść wiele wyników użytecznych przy projektowaniu kolejnych immunoterapii dla psów i ludzi.

Podejście innego typu zostało także zaproponowane przez Addissie i Klingemanna z firmy Nantkwest, specjalizującej się w tworzeniu rozwiązań terapeutycznych wykorzystujących ludzką linię komórek NK - NK-92⁷². W pracy z 2018 roku porównano aktywność cytotoksyczną komórek NK-92 oraz psich komórek NK (wyizolowanych z psiej krwi obwodowej) względem kilku linii psich nowotworów (CTAC, DH82, CF41, BW KOS). W każdym badanym przypadku liza komórek nowotworowych spowodowana działaniem komórek NK-92 była znacznie większa, niż liza wywołana aktywnością psich komórek NK⁴⁰. W 2017 roku Canter wraz ze współpracownikami zaprezentował wyniki badań pierwszej próby klinicznej na psach z użyciem psich komórek NK. Testy prowadzone były na psach chorujących na kostniakomięsaka (ang. osteosarcoma) i wykazały, że transfer komórek NK do pacjenta poprzedzony poddaniem pacjenta radioterapią zwiększa wrażliwość nowotworu na zabijanie przez komórki NK²⁴.

1.9. Immunoterapie u psów – wyzwania

Badania w kontekście immunoterapii u psów wydają się z jednej strony ułatwieniem i uzupełnieniem badań w tym zakresie realizowanych u ludzi, jednak z drugiej strony ich przeprowadzanie nie jest tak oczywiste, jakby mogło się wydawać myśląc o udogodnieniach, jakie studia dotyczące psów za sobą niosą. W zakresie badań podstawowych utrudnieniem jest przede wszystkim ograniczona wiedza o psim układzie odpornościowym, a także znikoma liczba odczynników specyficznych dla psiego gatunku – między innymi przeciwciał – co mocno ogranicza na przykład fenotypowanie psich komórek. Oprócz tego koszty przeprowadzania badań klinicznych na psach, różnice pomiędzy rasami czy decyzje właścicieli o przeprowadzeniu wcześniejszej eutanazji

zwierzęcia sprawiają, że immunoterapie u psów są niewielkim wycinkiem leczenia psich nowotworów⁷³.

2. Cel pracy

Poznanie biologii organizmów modelowych i określenie ich podobieństw z organizmem ludzkim jest ważną częścią projektowania podejść terapeutycznych dla człowieka. Pies z wielu względów wydaje się optymalnym organizmem modelowym, będącym jednocześnie ogniwem łączącym badania na gryzoniach z badaniami klinicznymi. Narzędziem badawczym pozwalającym na etyczne i wydajne studia nad biologią komórek organizmów modelowych są ustanowione linie komórkowe.

Bezpośrednim celem pierwszej części pracy było scharakteryzowanie pod względem fenotypowym i funkcjonalnym nowej linii komórkowej pochodzenia psiego, ponieważ przeprowadzone badania wstępne wykazały, że linia ta może wykazywać cechy komórek typu NK.

Jednocześnie, w dziedzinie terapii przeciwnowotworowych, dużym zainteresowaniem obecnie cieszą się immunoterapie, a zwłaszcza podejścia terapeutyczne wykorzystujące preparaty złożone z komórek typu NK, które ze względu na swoje naturalne powinowactwo do komórek nowotworowych, stają się skuteczną bronią zabijającą stansformowane komórki. Aktywność komórek NK można dodatkowo podnieść poprzez stosowanie czynników stymulujących, np. interleukin.

Druga część niniejszej pracy miała na celu ocenę wpływu interleukin: IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 na aktywność cytotoksyczną komórek nowej linii komórkowej pochodzenia psiego, mając na uwadze stymulujący wpływ tych cytokin na cytotoksyczność ludzkich oraz psich komórek typu NK.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały plastikowe jednorazowe

- Butelki hodowlane T25 (Nunc)
- Płytki 6-dołkowe (Corning Costar)
- Płytki 24-dołkowe (Corning Costar)
- Falcony 15 ml (Sarstedt)
- Falcony 50 ml (Sarstedt)
- Szalki Petriego do hodowli komórkowych 60 mm (Sarstedt)
- Szalki Petriego do hodowli komórkowych 100 mm (Sarstedt)
- Probówki cytometryczne 5 ml (Corning)
- Probówki typu Eppendorf 1,5 ml (Sarstedt)

3.2. Linie komórkowe

Do przeprowadzenia eksperymentów opisanych w niniejszej rozprawie użyto psich oraz ludzkich linii komórkowych zawartych w Tab. 2. Komórki hodowane były w inkubatorze z 5% CO₂ w 37°C z wilgotnym powietrzem w butelkach T25 lub (w przypadku linii NK-92) na płytkach 6-dołkowych. Komórki pasażowano 2-3 razy w tygodniu w celu zapewnienia optymalnej gęstości hodowli. Adherentne komórki CBIMEC wymagały trypsynizacji w celu oddzielenia komórek od podłoża. Trypsynizację wykonywano używając trypsyny (0,5 g/L) z EDTA 1 mM oraz czerwieni fenolową o pH 7,2 (PChO - Pracownia Chemii Ogólnej IITD, Wrocław). W dniu rozpoczęcia eksperymentu komórki wirowano (353g, 4°C, 5 min) w celu oddzielenia osadu komórkowego od starego medium i zawieszano w świeżym medium. Liczenie komórek wykonywano przy użyciu 0,04% błękitu trypanu (Hopkin & Williams) w komorze Bürkera (Fein-Optik) przy pomocy mikroskopu Olympus CKX53. W doświadczeniach używano płytek 6- oraz 24-dołkowych oraz szalek Petriego 60 oraz 100 mm. Do traktowania komórek używano rekombinowanych psich IL-2, IL-12, IL-21 oraz ludzkich IL-15 i IL-18 (RD Systems Europe). Do przepłukiwania komórek używano PBS – buforowany roztwór soli fizjologicznej - 0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHPO₄; pH 7 (PChO).

Tab. 2 Linie komórkowe użyte w niniejszej pracy

Nazwa linii	Gatunek	Typ linii	Źródło	Kompozycja medium	Zawartość surowicy	Literatura
CNK-89	pies	Białaczka/chłoniak komórek NK	IITD PAN/Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu/Przychodnia Weterynaryjna „Neo Vet” we Wrocławiu	A	10% FCS	Nieopublikowana
GL-1	pies	Białaczka B-komórkowa	Prof. Y.Fujino i H. Tsujimoto, University of Tokyo, Japonia	A	10% FCS	4
CLBL-1	pies	Chłoniak B-komórkowy	Prof. B. C. Rütgen, University of Veterinary Medicine, Wiedeń, Austria	A	15% FCS	5
CLB-70	pies	Białaczka B-komórkowa	IITD PAN/Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu/Przychodnia Weterynaryjna „Neo Vet” we Wrocławiu	A	10% FCS	74
CL-1	pies	Chłoniak T-komórkowy	Prof. Y.Fujino i H. Tsujimoto, University of Tokyo, Japonia	A	20% FCS	6
K562	człowiek	Erytroleukemia	Kolekcja IITD PAN	B	10% FCS	65
NK-92	człowiek	Chłoniak komórek NK	Kolekcja IITD PAN	C	12,5% FCS + 12,5% surowicy końskiej	72
CBIMEC	pies	Śródbłonek naczyń krwionośnych psiego płodu	Prof. C. Kieda oraz dr C. Grillon, Center for Molecular Biophysics, Orlean, Francja	D	2% FCS inaktywowana	Nieopublikowana

Objaśnienia: FCS (fetal calf serum; Gibco) – płodowa surowica cielęca

Rodzaje mediów:

A: Advanced RPMI-1640 (Gibco), L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich), Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma Aldrich): penicylina 100 U/ml, streptomycyna 100 U/ml, amfoterycyna B 0,25 µg/ml.

B: RPMI 1640 (PChO) L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich), glukoza 4,5g/L (POCH), HEPES 10 mM (Sigma Aldrich), pirogronian 1 mM (Sigma Aldrich), Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma Aldrich): penicylina 100 U/ml, streptomycyna 100 U/ml, amfoterycyna B 0,25 µg/ml.

C: alpha-MEM (Gibco), L-glutamina 2 mM (Sigma Aldrich), Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma Aldrich): penicylina 100 U/ml, streptomycyna 100 U/ml, amfoterycyna B 0,25 µg/ml, inozytol 0,2 mM (dodawany na świeżo), rhIL-2 100 U/ml (rekombinowana ludzka interleukina 2, dodawana na świeżo; RD Systems Europe).

D: OptiMEM GlutaMax (Gibco), Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma Aldrich): penicylina 100 U/ml, streptomycyna 100 U/ml, amfoterycyna B 0,25 µg/ml.

3.3. Ustanowienie psiej linii komórkowej CNK-89

Linia komórkowa została ustanowiona na bazie materiału (płynu z płuc) pobranego od psa rasy Cocker Spaniel cierpiącego na nieznaną rozrost limfoidalny. Materiał został pobrany od zwierzęcia tuż po eutanazji, która została przeprowadzona po przyjęciu psa do przychodni weterynaryjnej NeoVet, ze względu na agonalny stan zwierzęcia. Po eutanazji nie zostały wykonywane żadne dodatkowe badania, co nie pozwala na skonstruowanie opisu przypadku.

Materiał pierwotny został zawieszony w medium Advanced RPMI-1640 z 10% FCS i zwirowany. Zawiesina komórek została następnie kilkakrotnie przepłukana PBS, zawieszona w medium Advanced RPMI-1640 (20% FCS, L-glutamina 2 mM, penicylina 100 U/ml, streptomycyna 100 µg/ml), przeniesiona do butelki T25 i umieszczona w inkubatorze z 5% CO₂ w 37°C z wilgotnym powietrzem. Komórki wykazały szybką proliferację podczas pierwszego tygodnia hodowli; na tym etapie zawiesina zawierała komórki adherentne i nieadherentne oraz fibroblasty. Początkowo komórki pasażowano co 4-5 dni, jednak po kilku pasażach komórki nieadherentne zaczęły wykazywać większą aktywność proliferacyjną. Po dwóch tygodniach hodowli komórki nieadherentne zostały wybrane przez technika wyspecjalizowanego w wyprowadzaniu białaczkowych linii komórkowych, przeniesione do nowej butelki i hodowane dalej w celu otrzymania homogennej zawiesiny komórkowej. Komórki wybrane do dalszej hodowli charakteryzowały się zwiększonym rozmiarem i dużą szybkością namnażania w porównaniu do pozostałych komórek z hodowli. Pozostałe komórki z hodowli nie były dalej charakteryzowane. Komórki nieadherentne hodowano następnie przez 6 miesięcy i kilkakrotnie oceniano ich fenotyp poprzez cytometrię przepływową. Następnie komórki zostały poddane klonowaniu metodą rozcieńczeń. W tym celu komórki przeniesiono z butelki na płytkę 24-dołkową, a następnie wybrane populacje były rozcieńczane i przenoszone na płytkę 96-dołkową. Kolejno, odpowiednie populacje wybierano z płytki 96-dołkowej i przenoszono je do świeżej butelki, gdzie namnażano je, po czym zawieszano w medium Advanced RPMI-1640 z 20% FCS i 10% DMSO i umieszczano w ciekłym azocie. Końcowe fenotypowanie przeprowadzono, używając komórek z kilku serii mrożeń. Czynności związane z hodowlą materiału pierwotnego i wyprowadzeniem linii komórkowej CNK-89 wykonała mgr Ewa Ziolo.

3.4. Izolacja psich komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (cPBMC)

Psia krew obwodowa wykorzystana do izolacji komórek cPBMC została zakupiona w Banku Krwi dla Psów i Kotów we Wrocławiu lek. wet. Karol Kirstein. Izolację przeprowadzono metodą wirowania w gradiencie ficollu przy pomocy odczynnika Lymphosep, Lymphocyte Separation Media (Biowest) o gęstości 1,077 g/ml. Pełną krew rozcieńczono w stosunku 1:1 w PBS o temperaturze pokojowej (PChO IITD PAN) i ostrożnie nawarstwiono 6,5 ml roztworu na 3,5 ml ficollu o temperaturze pokojowej w probówce Falcon 15 ml. Probówki wirowano (259g, 22°C, 30 min), a następnie zebrano ostrożnie frakcję przypominającą biały kożuch, zawierającą komórki cPBMC, znajdującą się pod warstwą osocza. Komórki cPBMC wypłukano dwukrotnie w PBS FCS (I wirowanie: 353g, 10°C, 10 min, II wirowanie 353g, 4°C, 10 min), a następnie policzono. Doświadczenia przy użyciu komórek cPBMC wykonywano zawieszając komórki w medium RPMI 1640 10% FCS.

3.5. Określenie morfologii komórek NK

W celu określenia morfologii komórek CNK-89 wykonano zdjęcia komórek w hodowli za pomocą mikroskopu świetlnego odwróconego Olympus CKX53, a także przygotowano preparaty komórek zatężonych przy pomocy wirówki typu cytospin. W tym celu przygotowano rozmazy zawierające $1 \cdot 10^6$ komórek, zwirowano, a następnie wysuszono, utrwalono i zabarwiono hematoksyliną-eozyną (HE) w celu uwidocznienia jąder komórkowych oraz barwnikiem May-Grunwald w celu wybarwienia granul azurofilnych. Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu Zeiss Axio Imager.Z2.

3.6. Fenotypowanie za pomocą cytometrii przepływowej

Komórki CNK-89 w liczbie $5 \cdot 10^5$ komórek/próbkę umieszczono w probówkach cytometrycznych i inkubowano z wybranymi przeciwciałami monoklonalnymi skoniugowanymi z fluorochromem (listę przeciwciał zawarto w Tab. 3) w ciemności, w temperaturze 4°C przez 20 min. Po tym czasie komórki dwukrotnie przepłukano w 0,5 ml PBS z 1% FCS (PChO IITD PAN / Gibco) przy pomocy wirowania (353g, 5 min, 4°C). W przypadku barwienia epitopów cytoplazmatycznych (CD20 oraz CD79a) procedurę właściwego barwienia poprzedzała permabilizacja komercyjnym buforem (Dako) przez 15

min i jednokrotne płukanie. W przypadku barwienia CD20, CD79a, Thy-1 oraz NKp46 komórki barwiono przy użyciu przeciwciała II warstwy skoniugowanego z fluorochromem w temperaturze 4°C przez 20 min, a następnie płukano w PBS. Wybarwione i wypłukane komórki zawieszano w 0,4 ml PBS z 1% FCS i dokonywano odczytu przy pomocy cytometru przepływowego FACS Calibur (BD). Do każdego barwienia przeprowadzono odczyt odpowiedniej kontroli izotypowej. Z każdej próbki zbierano minimum 10 000 obiektów. Analizę przeprowadzono przy pomocy programu Flowing Software 2.5.1 (Perttu Terho, Turku, Finland). Doświadczenie wykonano 3 razy.

Tab. 3 Lista przeciwciał użytych do fenotypowania komórek CNK-89

Antygen	Klon przeciwciała	Izotyp	Producent
CD3 (FITC)	CA17.2A12	mIgG1	AbD Serotec
CD4 (PE)	YKIX302.9	rIgG2a	AbD Serotec
CD5 (FITC)	YKIX322.3	rIgG2a	AbD Serotec
CD8 (Alexa Fluor® 647)	YCATE55.9	rIgG1	AbD Serotec
CD14 (Alexa Fluor® 647)	TÜK4	mIgG2a	AbD Serotec
CD20	Sc7733	gIgG	Santa Cruz
CD21 (Alexa Fluor® 647)	CA2.1D6	mIgG1	AbD Serotec
CD34 (PE)	1H6	mIgG1	AbD Serotec
CD45 (PE)	YKIX716.13	mIgG2b	AbD Serotec
CD56 (PE)	MOC-1	mIgG1	Dako
CD79A (RPE)	HM57	mIgG1	Dako
Thy-1	YKIX337.217	rIgG2b	AbD Serotec
MHC II (FITC)	YKIX334.2	rIgG2a	AbD Serotec
IgG (FITC)	F7884	rIgG	Sigma Aldrich
IgM (FITC)	poliklonalne	gIgG	AbD Serotec
NKp46	48A	mIgG2a	Merck Millipore

Objaśnienia: r – rat (szczur), m – mouse (mysz), g – goat (koza)

3.7. Ocena poziomu transkrypcji genów za pomocą reakcji RT-PCR

3.7.1. Określenie fenotypu komórek CNK-89

Do przeprowadzenia reakcji RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) służącej oznaczeniu transkrypcji genów charakterystycznych dla komórek typu NK użyto komórek cPBMC, linii komórkowych: CNK-89, CLBL-1, CL-1 oraz cDNA z psiej śledziny (Zyagen). Procedura izolacji cPBMC została opisana w punkcie 3.3. RNA z $2 \cdot 10^6$ komórek cPBMC izolowano metodą Chomczyńskiego⁷⁵ przy użyciu TRIzol

Reagent (Invitrogen); opis procedury zawarto w punkcie 3.7.3. RNA z $1 \cdot 10^6$ komórek linii CNK-89, CLBL-1 oraz CL-1 izolowano metodą kolumnkową przy użyciu zestawu EZ-10 Spin Column Animal Total RNA Mini-Preps Kit (BIO BASIC INC.); opis procedury zawarto w punkcie 3.7.4. Badania wykonano w 2 powtórzeniach.

3.7.2. Określenie wpływu wybranych interleukin na komórki CNK-89

Do przeprowadzenia reakcji RT-PCR służącej określeniu wpływu interleukin: IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 oraz ich kombinacji na komórki CNK-89, komórki CNK-89 policzono i zawieszono $2 \cdot 10^6$ komórek w 2 ml świeżego medium na płytce 6-dołkowej. Następnie dodano interleukiny (każda w stężeniu 10 ng/ml) i inkubowano przez 48 godz. w standardowych warunkach hodowli. Po tym czasie medium oddzielono od osadu komórkowego poprzez wirowanie (353g, 4°C, 5 min) i zamrożono na minimum 24 godz. w temperaturze -30°C, natomiast z osadu komórek izolowano RNA metodą Chomczyńskiego⁷⁵ przy użyciu TRIzol Reagent (Invitrogen); opis procedury zawarto w punkcie 3.7.3. Zamrożone medium wykorzystano do wykonania oznaczeń IFN γ oraz TNF α w teście ELISA (punkty 3.10 i 3.11) oraz do oceny cytotoksyczności mediów (punkt 3.9).

3.7.3. Izolacja RNA w TRIzol Reagent

Osad komórek oddzielono od medium przy pomocy wirowania (353g, 4°C, 5 min), a następnie osad przepłukano w 1 ml PBS (353g, 4°C, 5 min). Supernatant usunięto, a osad zawieszono w 1 ml TRIzol Reagent i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min. Następnie próbki zamrożono na minimum 24 godz. w -80°C. Po rozmrożeniu próbek kolejne czynności wykonywano w temperaturze pokojowej. Do próbek dodano 200 μ l chloroformu, wymieszano przez 15 sek. poprzez obracanie i inkubowano 10 min. Po tym czasie próbki zwirowano (12 000g, 4°C, 15 min) i po rozdzieleniu przeniesiono ostrożnie górną (przezroczystą) fazę o objętości około 500 μ l do nowej eppendorfki. Kolejno, w celu otrzymania osadu RNA, do próbek dodano 500 μ l izopropanolu (stosunek 1:1), zmieszano przy pomocy Vortexu, inkubowano 10 min i zwirowano (12 000g, 4°C, 8 min). Supernatant usunięto, a do osadu dodano 1 ml 75% EtOH w celu jego przepłukania. Próbki zmieszano przy pomocy Vortexu i zwirowano (7 500g, 4°C, 5 min). Supernatant starannie usunięto, a próbki pozostawiono na 10 min, w celu umożliwienia odparowania resztek

EtOH. Po tym czasie próbki zawieszono w 20 μ l wody bez RNaz (RNase free water, Sigma Aldrich) i inkubowano przez 15 min w 60°C w celu lepszego rozpuszczenia RNA. Następnie stężenie i czystość RNA zmierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop2000 zgodnie z instrukcją producenta (ThermoFisher Scientific). Do dalszych badań wybrano próbki mające stężenie minimum 100 ng/ μ l i o stosunku absorbancji 260/280 pomiędzy 1,8 a 2,0.

3.7.4. Izolacja RNA metodą kolumnkową

Procedurę wykonano zgodnie z instrukcją producenta. Osad komórek oddzielono od medium przy pomocy wirowania (353g, 4°C, 5 min), a następnie zawieszono w 0,45 ml buforu RLT. Następnie dodano 0,2 ml EtOH i mieszano poprzez inwersję. Zawiesinę przeniesiono na kolumnkę i zwirowano (12000g, TP – temperatura pokojowa, 30 sek.), po czym opróżniono probówkę zbiorczą. Następnie na kolumnkę dodano 0,5 ml RW Solution, zwirowano (12000g, TP, 30 sek.), po czym opróżniono probówkę zbiorczą. Następnie na kolumnkę dodano 0,5 ml Universal RPE Solution, zwirowano (12000g, TP, 30 sek.), po czym opróżniono probówkę zbiorczą. Kolumnkę zwirowano ponownie (12000g, TP, 30 sek.) i umieszczono w świeżej probówce typu Eppendorf. Na kolumnkę naniesiono 50 μ l wody i inkubowano w TP przez 2 min. Po tym czasie kolumnkę zwirowano (12000g, TP, 30 sek.), a stężenie RNA w zawiesinie zmierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop2000 zgodnie z instrukcją producenta (ThermoFisher Scientific). Do dalszych badań wybrano próbki mające stężenie minimum 100 ng/ μ l i o stosunku 260/280 pomiędzy 1,8 a 2,0.

3.7.5. Trawienie DNazą

Kolejnym krokiem było wykonanie trawienia DNazą w celu usunięcia genomowego DNA mogącego dawać fałszywe wyniki. W tym celu użyto, zgodnie z instrukcją producenta, zestawu DNase I (ThermoFisher Scientific) oraz inhibitora RiboLock RNase Inhibitor (ThermoFisher Scientific). Końcowa objętość próbek wynosiła 20 μ l, składniki oraz przebieg reakcji zawarto w Tab. 4. Próbki inkubowano w termocyklerze Bio-Rad MJ PTC-200 przez 30 min w 37°C, a następnie dodano EDTA w celu przerwania reakcji enzymatycznej i inkubowano próbki przez 15 min w 65°C.

Tab. 4 Przebieg reakcji trawienia DNazą

Odczynnik/materiał	Objętość [ul]	inkubacja 37°C 30 min	Odczynnik/materiał	Objętość [ul]	inkubacja 65°C 15 min
bufor	2		+ EDTA 25 mM	1	
DNase I	1				
RiboLock	1				
matryca RNA	x				
woda	16-x				

x – objętość zawiesiny zawierającej 2,5 µg RNA

3.7.6. Ocena jakości RNA

Jakość RNA po trawieniu DNazą sprawdzono podczas elektroforezy w 1% żelu agarozowym w buforze TAE (Tris-acetate-EDTA). Skład buforu: 40 mM Tris, 20 mM kwas octowy, 1 mM EDTA. Próbkę nanoszono na żel w buforze 6x DNA Loading Dye (ThermoFischer Scientific). Do wizualizacji RNA użyto bromku etydyny. Do dalszych badań wybrano próbki, które w elektroforezie wykazały obecność 2 odrębnych prążków, reprezentujących 28S i 18S rRNA.

3.7.7. Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono korzystając z zestawu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific) zgodnie z instrukcją producenta. W skrócie, do reakcji użyto 1,5 µg RNA po trawieniu DNazą. Końcowa objętość próbki wynosiła 20 µl. Składniki oraz przebieg reakcji zamieszczono w Tab. 5. Po reakcji próbki rozcieńczono w wodzie RNase free do stężenia 5 ng/µl i przeprowadzono reakcję PCR w celu sprawdzenia poziomu transkrypcji poszczególnych genów.

Tab. 5 Przebieg reakcji odwrotnej transkrypcji

Odczynnik/materiał	Objętość [ul]	inkubacja:	25°C, 10 min	50°C, 30 min	85°C, 5 min
5X mix reakcyjny	4				
Maxima Enzyme Mix	2				
matryca RNA	x [1,5µg]				
woda	14-x				

3.7.8. Właściwa reakcja PCR

Do reakcji PCR użyto zestawu Taq Polymerase LC (ThermoFisher Scientific) wg instrukcji producenta. Do reakcji wykorzystano sekwencje starterów zaproponowane przez Shin i współpracowników¹⁴, zamieszczone w Tab. 6. Układ reakcyjny zawierał składniki zawarte w Tab. 7. Reakcję przeprowadzono zgodnie programem zawartym w

Tab. 8. Jako kontroli negatywnej reakcji PCR użyto wody (zamiast matrycy cDNA). Jako kontroli na obecność genomowego DNA użyto próbek RNA poddanych trawieniu DNA, które nie zostały poddane reakcji odwrotnej transkrypcji. Obecność produktów reakcji PCR sprawdzono za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym w buforze TAE. Próbki nanoszono na żel w buforze 6x DNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific). Do wizualizacji DNA użyto bromku etydyny, natomiast do oceny wielkości otrzymanych produktów reakcji użyto markera Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas/ThermoFisher Scientific). Doświadczenie wykonano w 2 powtórzeniach.

Tab. 6 Sekwencje starterów użytych do amplifikacji genów zawartych w psim cDNA.

Nazwa genu (nr dostępu GenBank)	Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa (5'–3')	Region (nt)	Rozmiar (pz)
β-aktyna (Z70044)	cActin-F	ACCAACTGGGACGACATGGAGA	165–186	205
	cActin-R	AGGCATACAGGGACAGGACAG	349–369	
CD56 (NM–001010950)	cCD56-F	ATTGTGTGTGATGTGGTCAGCTC	457–479	208
	cCD56-R	CCTGAATGTCTTGAAGTTGATC	642–664	
CD16 (XM–536141)	cCD16-F	ACAGTGTGACTCTGAAATGCCAG	119–141	188
	cCD16-R	GACTTCTAGCTGCACCGGGTCA	285–306	
NKG2D (XM–849013)	cNKG2D–F	GTTATTGTGGTCCGTGTCCTAA	188–209	222
	cNKG2D–R	ACTGCCAGGATCCATTTGTTGG	388–409	
NKp30 (DQ003484)	cNKp30-F	CTTCTTGCCGTGTTTCCTTCAA	51–71	236
	cNKp30-R	CCAGAACCTCCACTCTGCACA	266–286	
NKp44 (XM–846203)	cNKp44-F	ACCAGGTTAGTCAGCAGCTCCA	229–250	205
	cNKp44-R	CTGGAGACACTGCCAGATAGAAT	411–433	
NKp46 (XM–849055)	cNKp46-F	TATGATACGCCACTCTCTCCGTT	361–384	217
	cNKp46-R	ATCCAAAACATCTGTACGTCCTC	554–577	
Ly49 (AY191818)	cLy49-F	GATTCTTGGGATCCTGTGTTACT	300–323	236
	cLy49-R	GTAAATCCTGTTCCTTTTTCTGCTG	511–535	
Perforyna (FJ973622)	cPerforin-F	ACAGGTACAGCTTCAGCACTGAC	494–515	189
	cPerforin-R	CCATGGACCGGATGAAGTGGGT	661–682	
Granzym B (XM–547752)	cGZB-F	GGAGAGATCATCGGGGACATGA	448–470	195
	cGZB-R	CTCCTGTTTCCTTGATGTTGTGG	621–642	
iTCRα (DM176745)	iV3	GGACAGGTCCTGCTTCTCTG	221–240	338
	C2	GGCCCCCTCCGGTTTT	543–558	

Tabela przetłumaczona z ¹⁴.

Tab. 7 Składniki reakcji PCR

Odczynnik	Objętość [μ l]
Taq Polymerase LC	0,5
10 X Taq Buffer	2
dNTP [10 mM]	0,5
MgCl ₂ [25 mM]	1,2
Starter forward	1
Starter reverse	1
Matryca cDNA 30 ng	4
Woda	9,8

Tab. 8 Przebieg reakcji PCR

Krok	Liczba cykli	Czas [min]	Temperatura [°C]
Denaturacja wstępna	1	5	94
Denaturacja	30	0,5	94
Przyłączanie starterów		0,5	53
Wydłużanie		0,5	72
Wydłużanie końcowe	1	5	72

3.8. Test cytotoksyczności bezpośredniej

3.8.1. Barwienie komórek barwnikiem CellTrace Far Red (bCT)

Komórki docelowe wykorzystywane w testach cytotoksyczności 4- i 24-godzinnej barwiono barwnikiem CellTrace Far Red (bCT) (ThermoFisher Scientific) dzień przed rozpoczęciem eksperymentu (w przypadku testów 4-godzinnych) lub w dniu rozpoczęcia eksperymentu (w przypadku testów 24-godzinnych). Komórki liczone (w przypadku komórek CBIMEC liczenie poprzedzone było trypsynizacją opisaną w punkcie 3.2), a następnie oddzielono od medium poprzez wirowanie (353g, 4°C, 5 min), oraz płukano jednokrotnie w PBS (353g, 4°C, 5 min). Komórki zawieszano w PBS w proporcji 1*10⁶ komórek w 1 ml PBS (komórki GL-1, K562, CBIMEC) / PBS 2,5% FCS (komórki CLBL-1, CLB-70) i umieszczano w probówce Falcon 15 ml. Do zawiesiny komórkowej dodawano 1 µl barwnika bCT na każdy 1*10⁶ komórek i inkubowano (ciemność, 37°C, 20 min). Po inkubacji do zawiesiny dodawano PBS 2,5% FCS w proporcji 1:1 i płukano jednokrotnie (353g, 4°C, 5 min).

Komórki do testu 4-godzinnego zawieszano w odpowiednim dla nich medium w gęstości 3-4*10⁵ komórek/ml i inkubowano na płycie 24-dołkowej w warunkach hodowlanych przez noc. Następnego dnia przed rozpoczęciem testu komórki liczone, odpłukiwano z medium i zawieszano w medium odpowiednim dla komórek efektorowych.

Komórki do testu 24-godzinnego zawieszano w medium odpowiednim dla komórek efektorowych w dniu rozpoczęcia testu (wyjątek stanowiło medium w przypadku eksperymentów wykorzystujących komórki CLBL-1. Takie medium zawierało 15% FCS).

3.8.2. Przeprowadzenie testu

W momencie rozpoczęcia testu 5*10⁴ komórek docelowych łączono z odpowiednią liczbą komórek typu NK (linie CNK-89 lub NK92 oraz komórki cPBMC), by otrzymać stosunki: 1:1, 1:5, 1:10, 1:20 oraz 1:40. Komórki inkubowano w standardowych warunkach hodowli (inkubator z 5% CO₂ w 37°C z wilgotnym powietrzem) przez 4 lub 24 godz. na płytkach 24-dołkowych, a końcowa objętość w każdym dołku wynosiła 400 µl. Medium w którym inkubowano komórki efektorowe wraz z docelowymi dostosowane było do potrzeb i optymalnej aktywności komórek efektorowych; warunki te zamieszczono w Tab. 9.

Tab. 9 Rodzaje linii komórkowych oraz mediów wykorzystywanych w eksperymentach bezpośredniej cytotoksyczności

Komórki efektorowe (E)	Komórki docelowe (T)
NK-92 (człowiek) α-MEM 10% FCS+ inozytol	K562 (człowiek)
cP BMC (pies) RPMI 10% FCS	CLB70 (pies) CLBL-1 (pies)
CNK-89 (pies) Advanced RPMI 10% * FCS	GL-1 (pies) CBIMEC (pies)

Objaśnienia: * - w przypadku inkubacji 24-godz. komórek CLBL-1 użyto medium zawierającego 15% FCS

Po tym czasie wszystkie komórki zbierano (w przypadku użycia komórek CBIMEC przeprowadzano trypsynizację opisaną w punkcie 3.2), barwiono PI (propidium iodide, jodek propidyny; Sigma-Aldrich) w stężeniu 1 µg/ml w PBS Mg²⁺ Ca²⁺ w objętości 100 µl przez 1 min, a następnie dodano 300 µl PBS Mg²⁺ Ca²⁺ i odczytywano wynik przy pomocy cytometru BD LSRFortessa. Do analizy zbierano minimum 1*10⁴ komórek docelowych wybarwionych bCT i porównywano liczbę komórek zabarwionych PI (komórek martwych) do komórek niezabarwionych PI (komórek żywych). Zawartość martwych komórek docelowych wyrażono dla każdej próbki w procentach, a następnie obliczono procentową cytotoksyczność komórek typu NK dla każdego stosunku, korzystając ze wzoru (1). Kontrolę spontanicznej śmierci stanowił pomiar frakcji martwych komórek w próbce zawierającej wyłącznie wybarwione komórki docelowe, bez dodatku komórek efektorowych. Test wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych.

$$\text{Cytotoksyczność (\%)} = \frac{(\text{martwe } T (\%) - \text{spontaniczna śmierć } T (\%)) * 100}{(100 - \text{spontaniczna śmierć } T (\%))} \quad (1)$$

T (target) – komórki docelowe

3.8.3. Rodzaje przeprowadzonych testów cytotoksyczności bezpośredniej

- a) test obejmujący komórki efektorowe nietraktowane: komórki efektorowe pobierano z hodowli w dzień rozpoczęcia eksperymentu i inkubowano z komórkami docelowymi przez 4 lub 24 godz.

- b) test obejmujący krótkoterminowy wpływ interleukin na cytotoksyczność komórek efektorowych: komórki efektorowe preinkubowano IL-12, IL-18 oraz kombinacją IL-12+IL-18 (każda IL w stężeniu 10 ng/ml) przez 48h na szalkach Petriego, usuwano medium poprzez wirowanie, zawieszano w świeżym medium i inkubowano z komórkami docelowymi. Jednocześnie przygotowywano także próby obejmujące komórki efektorowe nietraktowane .
- c) test obejmujący długoterminowy wpływ interleukin na cytotoksyczność komórek efektorowych: komórki efektorowe preinkubowano IL-12, IL-18 oraz kombinacją IL-12+IL-18 (każda IL w stężeniu 10 ng/ml) przez 48 godz. na szalkach Petriego, usuwano medium poprzez wirowanie, zawieszano w świeżym medium hodowlanym, inkubowano przez kolejne 48 godz. (t2) oraz 7 dni (t7.), zawieszano w świeżym medium hodowlanym i inkubowano z komórkami docelowymi. Jednocześnie przygotowywano także próby obejmujące komórki efektorowe preinkubowano interleukinami przez 48 godz., pozbawione medium z interleukinami w dzień testu (t0).

3.9. Pomiar cytotoksyczności medium znad komórek CNK-89

Na płytkę 24-dołkową wysiano komórki docelowe: GL-1, CLBL-1 oraz CLB70 w liczbie $1 \cdot 10^5$ komórek w objętości 0,5 ml medium Advanced RPMI (10% FCS dla komórek GL-1 i CLB70, 15% FCS dla komórek CLBL-1), po czym dodano po 0,1 ml rozmrożonego medium znad komórek inkubowanych z interleukinami. Kontrolę eksperymentu stanowiły próbki medium z odpowiednimi interleukinami (10 ng/ml), inkubowanymi przez 48 godz. bez udziału komórek CNK-89 w celu oceny, czy efekt cytotoksyczny wobec komórek docelowych nie jest wynikiem działania interleukin. Całość inkubowano przez 24 godz. w warunkach hodowlanych. Po tym czasie komórki docelowe wybarwiono przy użyciu zestawu Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich) oraz PI. W tym celu komórki docelowe przeniesiono do probówek FACS i zwirowano (353g, 4°C, 5 min), następnie odrzucono supernatant, dodano 0,5 ml PBS i ponownie zwirowano (353g, 4°C, 5 min). Supernatant odrzucono, komórki zawieszono w objętości 0,1 ml roztworu zawierającego Annexin V z fluorochromem FITC (0,5 µl odczynnika na próbkę) oraz PI (stężenie 2 µg/ml) rozcieńczonych w buforze producenta. Komórki inkubowano z

barwnikami w ciemności przez 15 min, a następnie dodano po 0,3 ml PBS i przystąpiono do odczytu. Pomiarów dokonywano przy użyciu cytometru FACSCalibur (Beckton Dickinson), a wyniki analizowano w programie Flowing Software 2.5.1 (Perttu Terho, Turku, Finland). Za komórki apoptotyczne uznano komórki pozytywne względem Annexin V oraz PI. Badania wykonano w 2 powtórzeniach.

3.10. Pomiar poziomu wydzielanego IFN γ

Pomiar wydzielanego IFN γ przeprowadzono przy użyciu zestawu Canine Interferon Gamma ELISA Kit (Sigma-Aldrich), wykorzystując medium z inkubacji komórek CNK-89 z interleukinami z punktu 3.7.2. Test wykonywano w temperaturze pokojowej, próbki nakładano w 2 powtórzeniach. Test rozpoczęto nałożeniem próbek oraz standardu w objętości 100 μ l każda i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2,5 godz. Następnie zawartość dołków płukano 4-krotnie roztworem do płukania z zestawu, nakładano detekcyjne przeciwciała biotynylowane w objętości 100 μ l i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie wykonywano ponownie 4-krotne płukanie, nakładano roztwór HRP-Streptawidyna w objętości 100 μ l i inkubowano przez 45 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wykonano 4-krotne płukanie i nakładano 100 μ l odczynnika ELISA Colorimetric TMB Reagent i inkubowano przez kilkanaście minut w ciemności, kontrolując stopień zabarwienia próbek. Po tym czasie reakcję przerywano dodając 50 μ l odczynnika Stop Solution i dokonywano odczytu absorbancji na czytniku płytek Wallac 1420 VICTOR2 (PerkinElmer) przy długości fali 450 nm. Na podstawie wyników otrzymanych dla standardu wykreślano w programie Excel krzywą standardową i z jej równania obliczano zawartość IFN- γ w danym dołku. Wyniki z 2 powtórzeń biologicznych uśredniono i naniesiono na wykres wraz z wartościami \pm SD.

3.11. Pomiar poziomu wydzielanego TNF α

Pomiar wydzielanego TNF α przeprowadzono przy użyciu zestawu Canine TNF α ELISA Kit (RD Systems Europe), wykorzystując medium z inkubacji komórek CNK-89 z interleukinami z punktu 3.7.2. Test wykonywano w temperaturze pokojowej, próbki nakładano w 2 powtórzeniach. Test rozpoczęto nałożeniem próbek oraz standardu w objętości 50 μ l każda i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godz. Następnie

zawartość dołków płukano 4-krotnie roztworem do płukania z zestawu, nakładano detekcyjne przeciwciało skoniugowane z HRP w objętości 100 μ l i inkubowano przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie wykonywano ponownie 4-krotne płukanie, nakładano substrat w objętości 100 μ l i inkubowano przez kilkanaście minut w ciemności, kontrolując stopień zabarwienia próbek. Po tym czasie reakcję przerywano dodając 100 μ l odczynnika Stop Solution i dokonywano odczytu na czytniku płytek Wallac 1420 VICTOR2 (PerkinElmer) przy długości fali 450 nm. Na podstawie wyników otrzymanych dla standardu wykreślano w programie Excel krzywą standardową i z jej równania obliczano zawartość IFN- γ w danym dołku. Wyniki z 2 powtórzeń biologicznych uśredniono i naniesiono na wykres wraz z wartościami \pm SD.

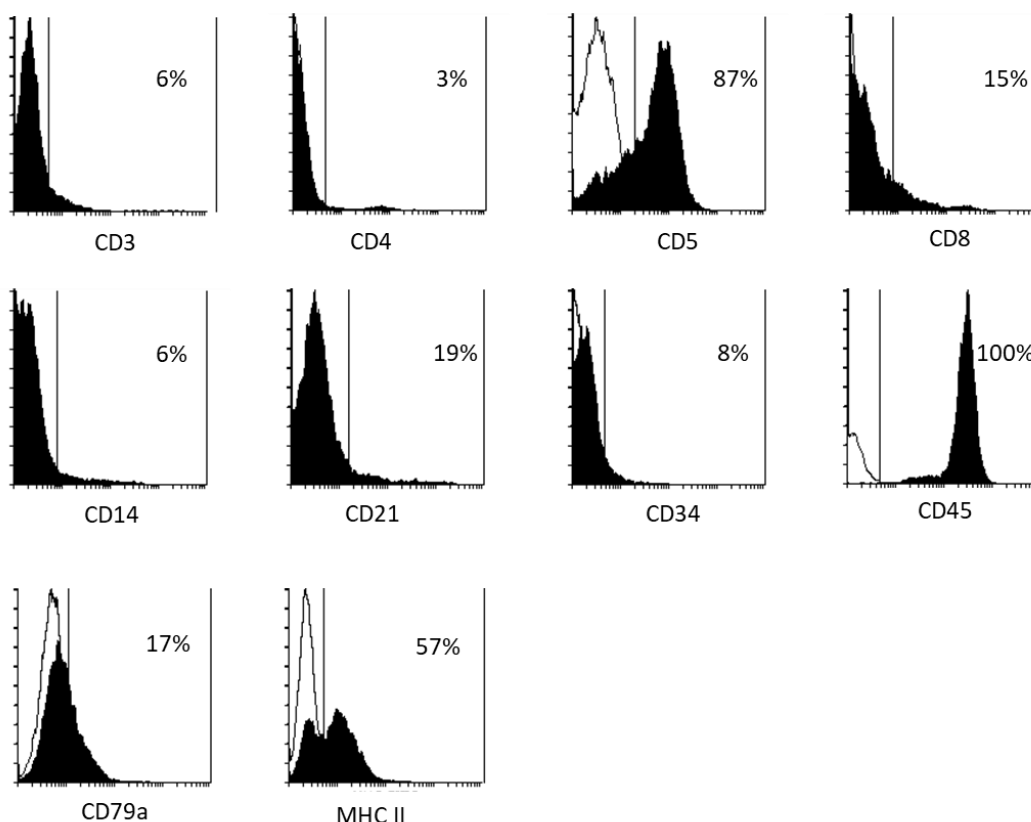
3.12. Analiza statystyczna

Wartości % otrzymane w wyniku obliczeń wykorzystujących równanie (1) zostały uśrednione i naniesione na wykresy wraz z wartościami SD (odchylenia standardowego) obliczonego na podstawie trzech niezależnych eksperymentów. Wpływ interleukin na cytotoksyczność komórek CNK-89 wobec komórek docelowych był porównywany z cytotoksycznością komórek CNK-89 nietraktowanych; do porównania tych wartości użyto testu t-Student przy poziomach istotności * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ oraz *** $P < 0.005$. Analizę przeprowadzono w programie Excel.

4. Wyniki

4.1. Ustanowienie linii komórkowej CNK-89

Materiał do analizy, z którego powstała linia komórkowa, będąca przedmiotem niniejszej rozprawy, pobrany został od psa z niezidentyfikowanym rozrostem limfoidalnym, tuż po wykonaniu eutanazji zwierzęcia. Materiał pozyskano z płynu opłucnowego poprzez biopsję cienkoigłową. W doświadczeniu użyto panelu przeciwciał identyfikujących białka powierzchniowe charakterystycznych dla komórek krwi. Dla każdego barwienia użyto odpowiedniej kontroli izotypowej (oznaczonej na histogramie czarnym konturem z pustym polem). Sygnał pochodzący od próbek badanych został natomiast zaznaczony jako czarne pole na wykresie. Wstępna analiza cytometryczna komórek wykazała obecność markerów CD5 oraz CD45, natomiast brak markerów CD3, CD4, CD14, CD34 oraz CD21. Ponad połowa komórek wykazała obecność markerów MHC II, a niewielka część obecność CD21, CD79 α oraz CD8 (Ryc. 5).



Ryc. 5 Reprezentatywne histogramy obrazujące fenotyp materiału pierwotnego. Białe pole przedstawia obraz z kontroli izotypowej, czarne pole przedstawia obraz z próbki barwionej odpowiednim przeciwciałem.

Po trzech miesiącach ciągłej hodowli, linia CNK-89 została ustanowiona poprzez klonowanie metodą rozcieńczeń. Na początku hodowli komórki limfoidalne zaczęły formować duże agregaty unoszące się nad populacją komórek adherentnych, Początkowo liczba komórek limfoidalnych pozostawała stała (komórki dzieliły się, ale także umierały). Podczas tego okresu hodowli, medium hodowlane było zmieniane lub uzupełniane 1-2 razy w tygodniu, w zależności od gęstości hodowli. Podczas kolejnych miesięcy ciągłej hodowli, komórki zachowywały swój immunofenotyp (oceniany poprzez pomiar cytometryczny). Komórki w formie ustanowionej linii wykazują czas podziału około 26 godz. Wzrost komórek CNK-89 jest niezależny od dodatkowych czynników wzrostu oraz cytokin. Linia CNK-89 wymaga pasażowania co 2-3 dni. Optymalna gęstość komórek CNK-89 w hodowli wynosi $0,5-1 \cdot 10^6$ komórek w 1 ml medium.

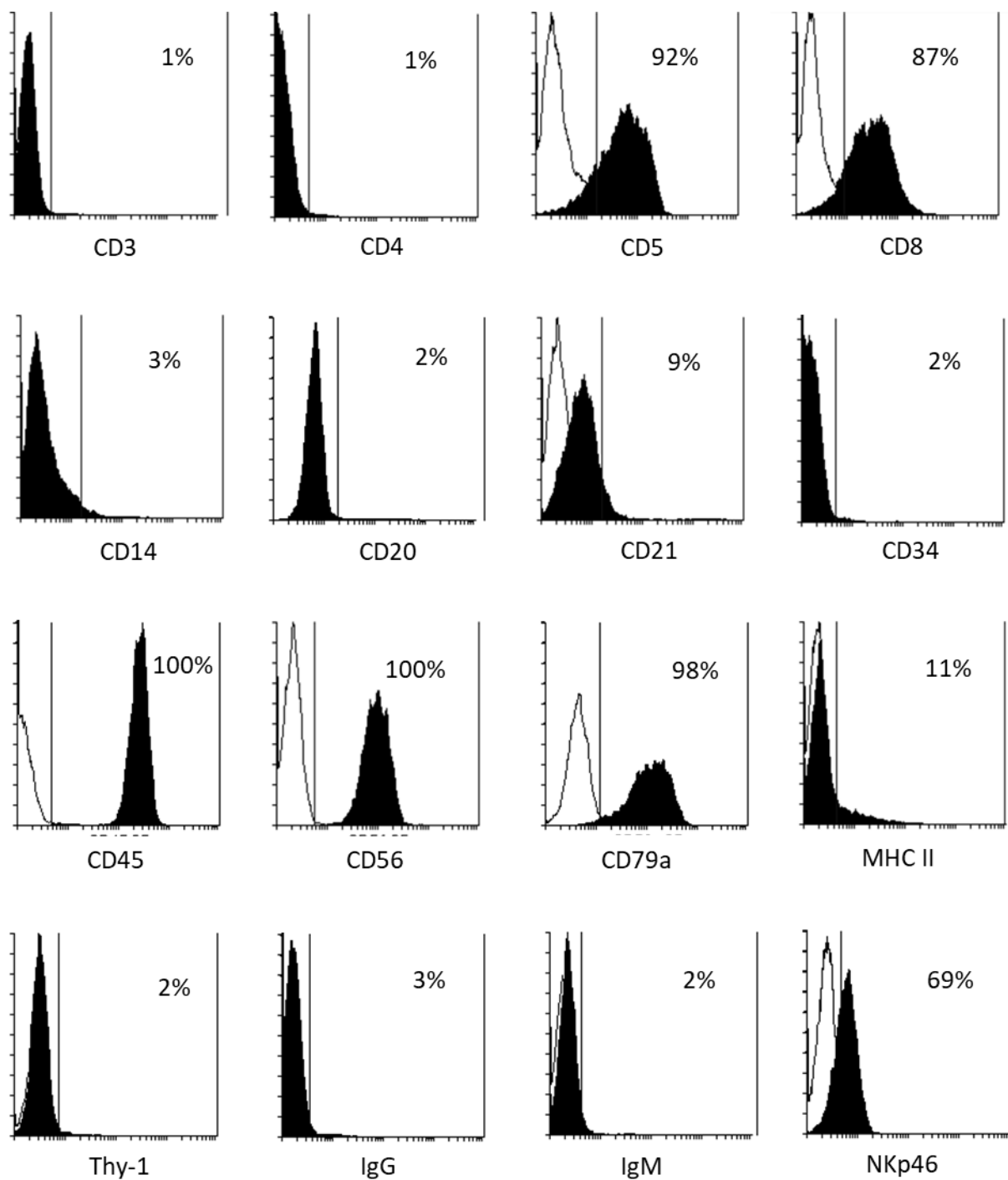
4.2. Analiza fenotypowa i morfologiczna komórek CNK-89

4.2.1. Analiza fenotypowa komórek CNK-89 za pomocą cytometrii przepływowej

W celu określenia fenotypu wyprowadzonej linii komórkowej przeprowadzono analizę fenotypową przy pomocy cytometrii przepływowej. W doświadczeniu użyto panelu przeciwciał identyfikujących białka powierzchniowe charakterystycznych dla komórek krwi. Dla każdego barwienia użyto odpowiedniej kontroli izotypowej (oznaczonej na histogramie czarnym konturem z pustym polem). Sygnał pochodzący od próbek badanych został natomiast zaznaczony jako czarne pole na wykresie.

Linia CNK-89 wykazała obecność markerów: CD5, CD8, CD45, CD56, CD79a i NKp46 oraz nieobecność markerów CD3, CD4, CD14, CD20, CD21, CD34, Thy1, IgG, IgM oraz MHC II (Ryc. 6 Ryc. 6). Nieobecność markerów CD3 oraz CD4 wykluczyła fenotyp limfocytów T, natomiast brak markera CD14 wyeliminował możliwość fenotypu monocytów/makrofagów. Brak powierzchniowych IgG oraz IgM, wraz z brakiem białek CD20 i CD21 wskazał na absencję fenotypu limfocytów B. Negatywny sygnał dla CD34 wykluczył obecność komórek macierzystych. Obecność markera CD45 wskazała, iż badane komórki są leukocytami. Komórki CNK-89 wykazały także pozytywną reakcję z przeciwciałem anti-CD79a, identyfikującym to białko na komórkach typu B oraz w niektórych białaczkach pochodzących od komórek NK/T. Pozytywny sygnał dla białek: CD56, CD5 i CD8 oraz NKp46 zasugerował możliwość wystąpienia fenotypu komórek NK. Wyniki potwierdzają zarazem homogenność badanej linii komórkowej. Na podstawie

uzyskanych wyników przystąpiono do analizy RT-PCR w celu potwierdzenia fenotypu NK.

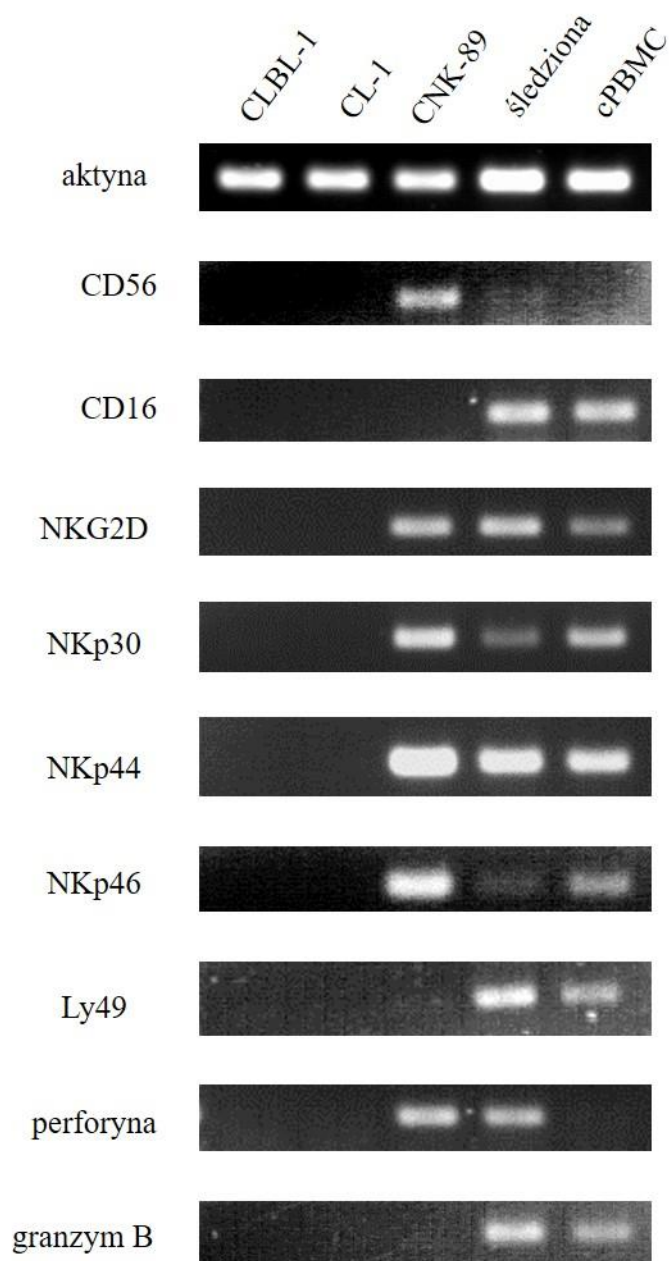


Ryc. 6 Reprezentatywne histogramy obrazujące fenotyp linii komórkowej CNK-89. Białe pole oznacza obraz z kontroli izotypowej, czarne pole oznacza obraz z próbki barwionej odpowiednim przeciwciałem.

4.2.2. Analiza wybranych transkryptów komórek CNK-89 za pomocą reakcji RT-PCR

Analizę fenotypową komórek CNK-89 za pomocą reakcji RT-PCR przeprowadzono w celu dalszej identyfikacji markerów charakterystycznych dla komórek typu NK, co wstępnie zasugerowały wyniki z fenotypowania za pomocą cytometrii przepływowej. Metoda RT-PCR jest w tym wypadku alternatywą dla fenotypowania za pomocą cytometrii przepływowej, zastosowaną z konieczności (ograniczona dostępność przeciwciał rozpoznających psie białka powierzchniowe na komórkach typu NK). Doświadczenie przeprowadzono na matrycy RNA, ponieważ celem było sprawdzenie, czy wybrane geny ulegają transkrypcji. Wykorzystano startery dla markerów: CD56, CD16, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, Ly49, perforyny i granzymu B. Jako komórek kontrolnych użyto komórek linii CLBL-1, CL-1, psich komórek PBMC (cPBMC) oraz komórek psiej śledziony. Komórki CLBL-1 oraz CL-1 służyły jako kontrola negatywna, ponieważ, będąc odpowiednio komórkami typu B oraz T nie powinny wykazywać obecności markerów typowych dla komórek NK. Komórki śledziony oraz komórki cPBMC są z kolei źródłem komórek NK, zatem traktowane były jako kontrole pozytywne.

Analiza za pomocą reakcji RT-PCR potwierdziła obecność transkryptu markera CD56, który, jako białko, zidentyfikowany został przy pomocy cytometrii przepływowej. Nie wykryto natomiast markera CD16. Transkryptu CD56 oraz CD16 nie zidentyfikowano w komórkach linii CLBL-1 oraz CL-1, co potwierdza prawidłowość doboru kontroli negatywnej. CD56 nie uwidoczniono także w komórkach śledziony oraz cPBMC, natomiast zidentyfikowano transkrypt dla CD16. W komórkach CNK-89, śledziony oraz cPBMC zidentyfikowana została obecność mRNA dla receptorów aktywujących NKp30, NKp44, NKp46 oraz NKG2D. Perforynę uwidoczniono w komórkach CNK-89 oraz w komórkach śledziony. W komórkach CNK-89 nie wykryto natomiast granzymu B ani markera Ly49, widocznych w komórkach śledziony oraz cPBMC. Wyniki przedstawiono na Ryc. 7.

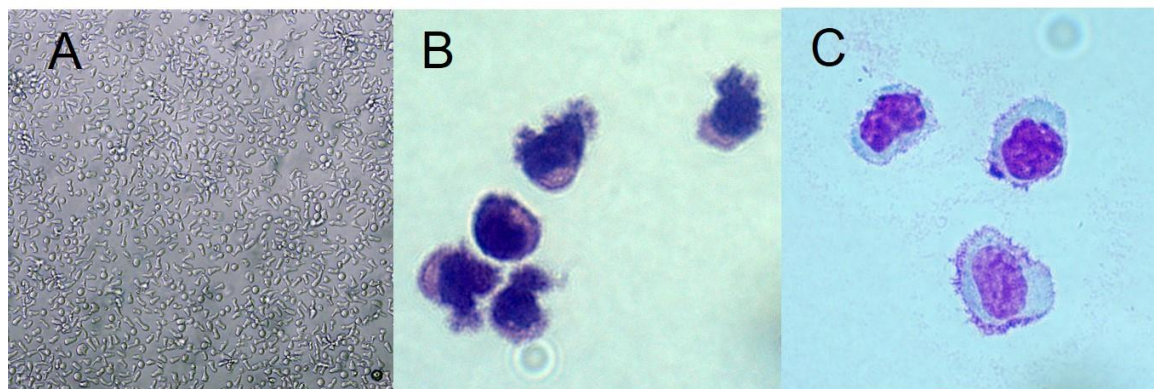


Ryc. 7 Identyfikacja transkryptów markerów komórek typu NK w komórkach linii CNK-89. Komórki CLBL-1 oraz CL-1 użyte zostały jako kontrola negatywna, komórki psiej śledziony oraz cPBMC zostały użyte jako kontrola pozytywna.

4.2.3. Morfologia komórek CNK-89

Komórki linii CNK-89 formowały homogeną populację składającą się z niewielkich komórek o kształcie owalnym, zawierających duże jądro o owalnym kształcie wybarwione na kolor ciemnofioletowy oraz widoczne jąderka. Bazofilna cytoplazma zajmowała niewielką część komórki. Część komórek w fazie intensywnego wzrostu

cechowała się bardziej okrągłym, niż wydłużonym kształtem. Barwienie nie wykazało obecności widocznych granul azurofilnych (Ryc. 8).



Ryc. 8 Zdjęcia komórek CNK-89. A – komórki w hodowli, zdjęcie wykonane za pomocą odwróconego mikroskopu świetlnego, powiększenie 10x, B – komórki wybarwione HE (hematoxylin-eosin), zdjęcie wykonane za pomocą odwróconego mikroskopu świetlnego, powiększenie 100x, C – komórki wybarwione barwnikiem MGG (May-Grünwald-Giemsa), zdjęcie wykonane za pomocą odwróconego mikroskopu świetlnego, powiększenie 100x.

4.3. Bezpośrednie właściwości cytotoksyczne komórek CNK-89

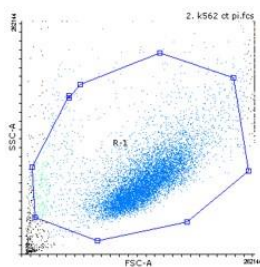
4.3.1. Opracowanie metody badania bezpośrednio cytotoksyczności

Kluczowym krokiem w charakterystyce funkcjonalnej komórek CNK-89 jest ocena ich bezpośrednich właściwości cytotoksycznych względem docelowych komórek nowotworowych. Historycznie często używaną metodą do tego celu był pomiar wydzielania radioaktywnego chromu (^{51}Cr) przez umierające komórki docelowe, jednak z powodu braku laboratorium izotopowego, na potrzeby niniejszego projektu zdecydowano się opracować schemat eksperymentalny oparty na pomiarze cytometrycznym. Podczas opracowywania metody bazowano na eksperymentach zamieszczonych w źródle⁷⁶. Komórki docelowe (komórki nowotworowe; target; T) znakowano komercyjnie dostępnym barwnikiem CellTrace™ Far Red (bCT; $\lambda_{\text{wzbudzenia}} = 630 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisji}} = 661 \text{ nm}$), by umożliwić odróżnienie populacji komórek docelowych od efektorowych podczas późniejszego pomiaru cytometrycznego, a następnie łączono z komórkami efektorowymi (komórki typu NK; effector; E). Całość inkubowano w medium optymalnym dla komórek efektorowych przez wybrany czas. W eksperymentach tego typu ważny jest dobór liczby komórek efektorowych atakujących komórki nowotworowe. Zwykle efektywna reakcja cytotoksyczności ma miejsce, gdy zastosowany jest nadmiar komórek efektorowych względem komórek docelowych, zatem w schematach eksperymentalnych uwzględnia się kilka stosunków liczby komórek efektorowych do komórek docelowych. W

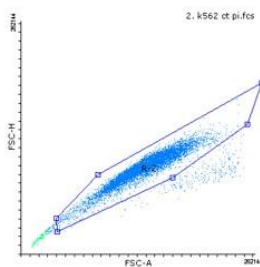
eksperymentach zawartych w niniejszej rozprawie używano następujących stosunków E:T: 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 40:1. Komórki dwóch linii inkubowano przez 4 godziny. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe, wybarwione bCT. Następnie komórki barwiono znacznikiem wykrywającym komórki martwe – PI ($\lambda_{\text{wzbudzenia}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisji}} = 617 \text{ nm}$) i rozpoczynano pomiar od kontroli eksperymentu, w której bramkowano populację kontrolną komórek docelowych wykazujących wysoką fluorescencję w kanale dla długości dalekiej czerwieni. W wybramkowanej populacji oznaczano poziom fluorescencji w kanale dla świecenia PI i oznaczano % komórek pozytywnych dla PI (komórek martwych). Szczegółową strategię bramkowania przedstawiono na Ryc. 9.

By sprawdzić działanie metody w praktyce, zdecydowano się na pomiar cytotoksyczności ludzkiej linii komórkowej typu NK (NK-92) względem ludzkich komórek białaczkowych: K562. W literaturze taki układ eksperymentalny jest dobrze opisany, a komórki NK-92 wykazują cytotoksyczność względem wrażliwych na zabijanie przez limfocyty NK komórek K562.

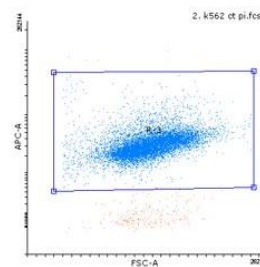
W wyniku eksperymentu komórki NK-92 wykazały cytotoksyczność względem komórek K562, której intensywność była zależna wprost proporcjonalnie do stosunku E:T, co potwierdziło skuteczność opracowanej metody (Ryc. 10).



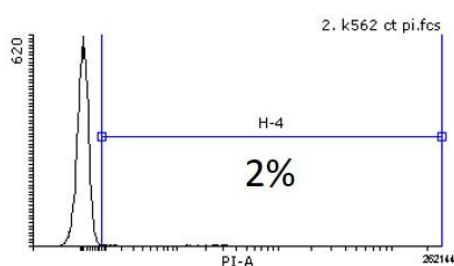
1. Wybranie populacji zawierającej komórki



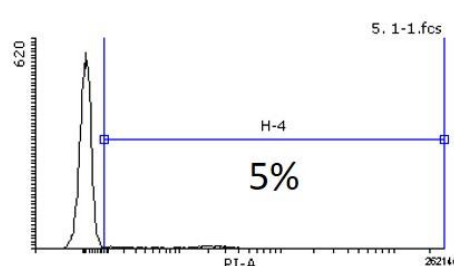
2. Wykluczenie dubletów



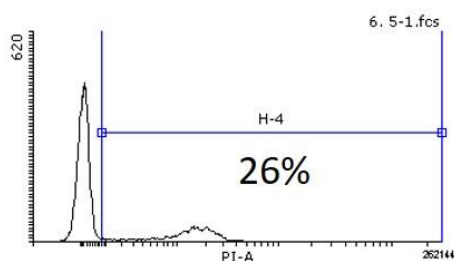
3. Wybranie populacji komórek pozytywnej względem barwnika CellTrace (komórki docelowe; T). Zebranie min. 10 000 zdarzeń w niniejszej bramce.



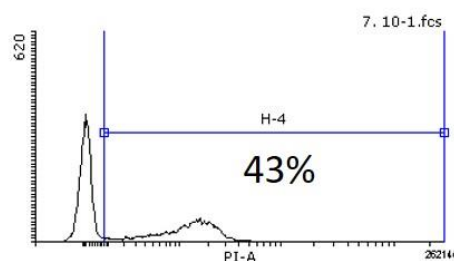
4. Wybranie populacji pozytywnej względem PI – CTRL.



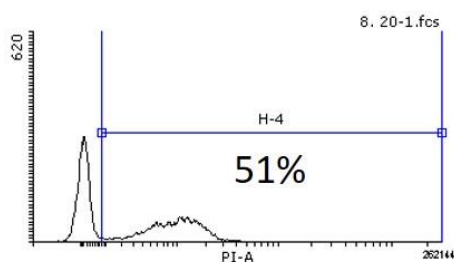
5. Stosunek E:T 1:1



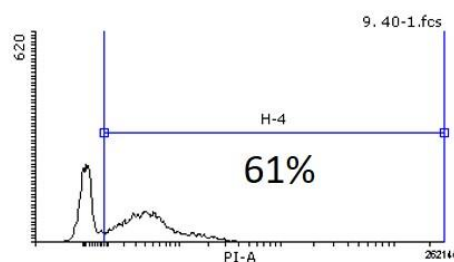
6. Stosunek E:T 5:1



7. Stosunek E:T 10:1



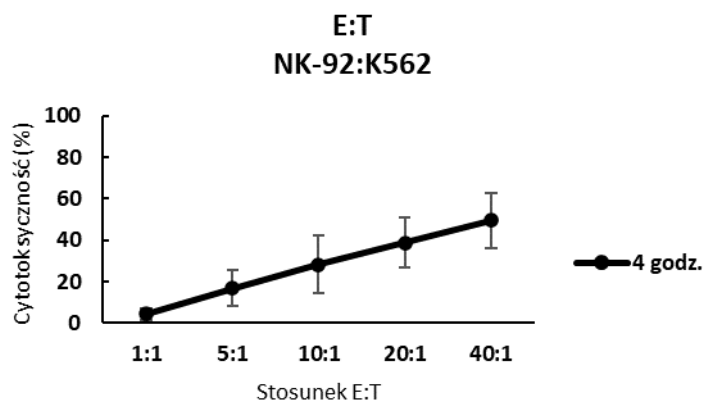
8. Stosunek E:T 20:1



9. Stosunek E:T 40:1

$$\text{Cytotoksyczność (\%)} \text{ dla } E:T 40:1 = \frac{(61\% - 2\%) + 100}{(100 - 2\%)} = 60\%$$

Ryc. 9 Strategia bramkowania komórek użyta w eksperymentach pomiaru bezpośredniej cytotoksyczności populacji komórek cytotoksycznych względem komórek docelowych.

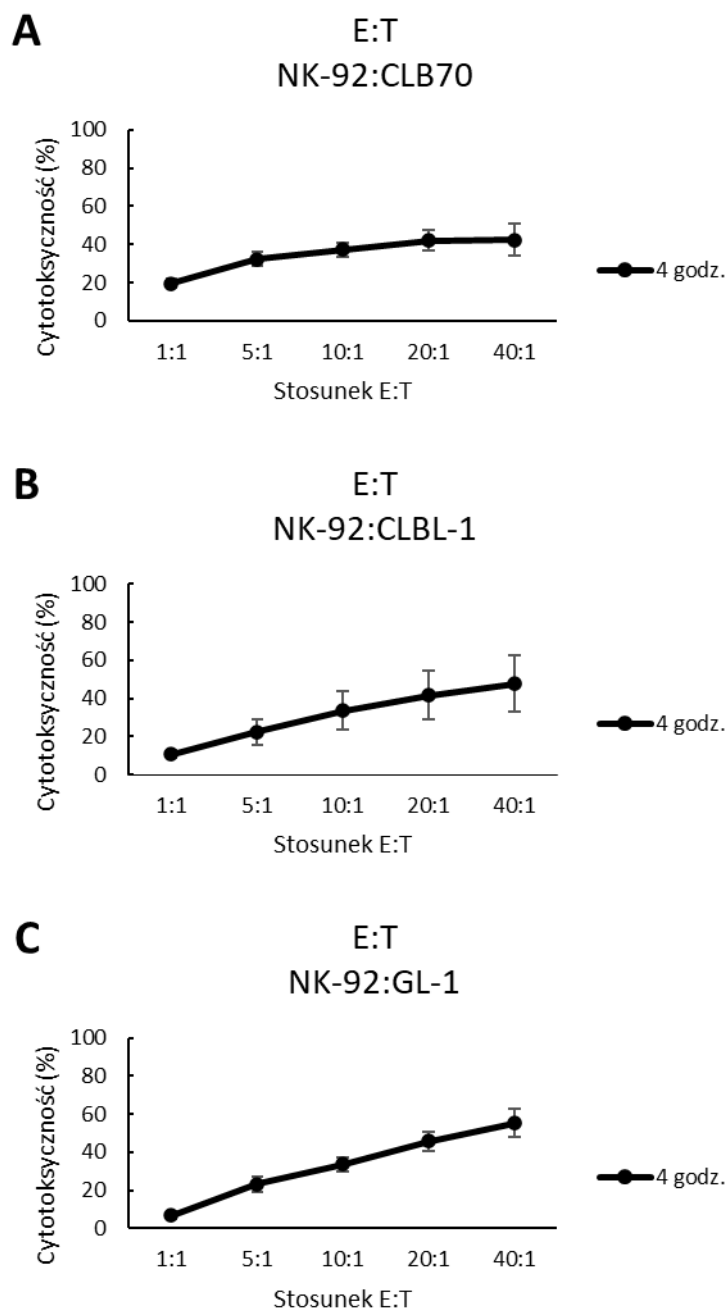


Ryc. 10 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych ludzkiej linii typu NK (NK-92 = E) względem komórek docelowych ludzkiej linii nowotworowej (K562 = T). Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykres ilustruje wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresie zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów.

4.3.2. Ocena wrażliwości psich komórek nowotworowych typu B na cytotoksyczność ludzkich komórek NK-92 po 4 godzinach

Celem niniejszego eksperymentu było zbadanie, czy wybrane linie psich białaczek/chłoniaków typu B są wrażliwe na zabijanie przez komórki typu NK, ponieważ w literaturze nie opisano do tej pory wykorzystania psich komórek tego typu. Wybrano 3 linie psich białaczek/chłoniaków typu B: GL-1, CLBL-1 oraz CLB-70, służących jako komórki docelowe. Jako komórek efektorowych użyto ludzkiej linii NK-92. Komórki inkubowano w układzie E:T przez 4 godziny, w stosunkach 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 40:1. Jako kontroli eksperymentu użyto próbek zawierających wyłącznie komórki docelowe: GL-1, CLBL-1 lub CLB-70 wybarwione bCT.

Wszystkie testowane psie linie docelowe okazały się wrażliwe na zabijanie przez ludzkie komórki NK-92. Poziom cytotoksyczności był zależny wprost proporcjonalnie od stosunku E:T. Największy efekt cytotoksyczny zaobserwowano w przypadku komórek docelowych GL-1. Komórki CLB-70 oraz CLBL-1 wykazały mniejszą wrażliwość na zabijanie przez komórki NK-92 (Ryc. 11).

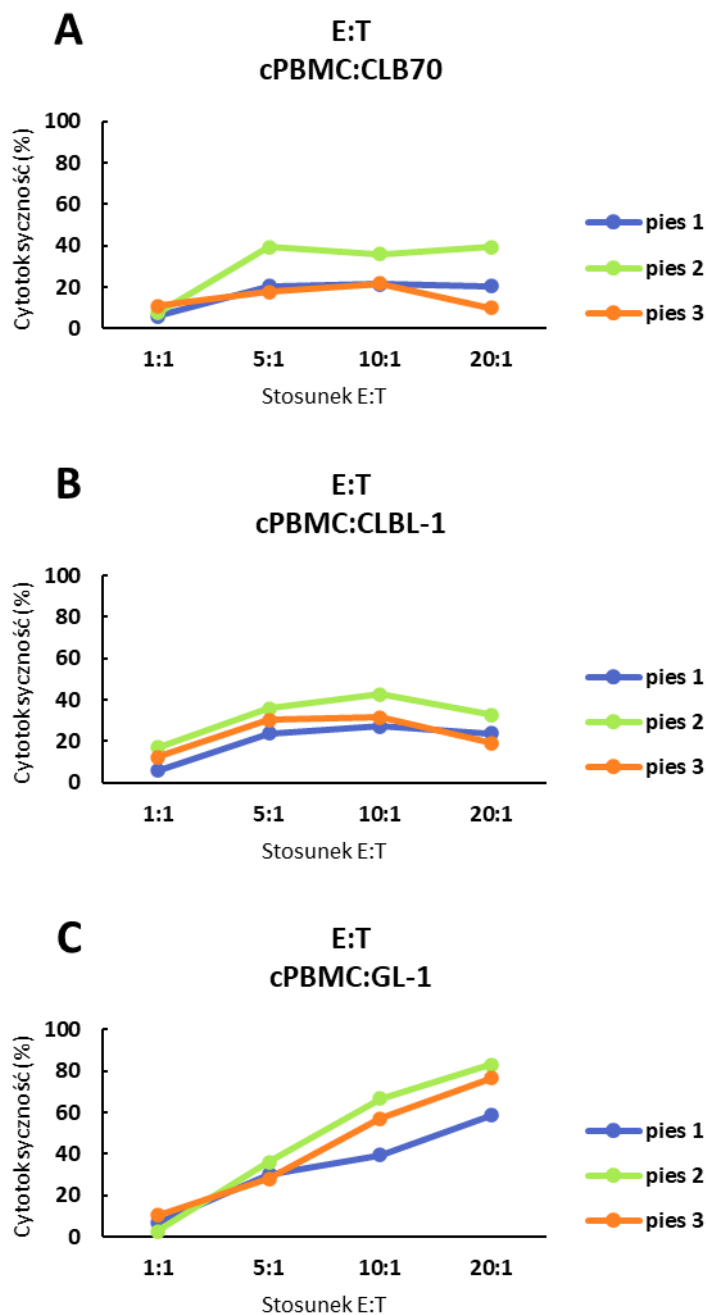


Ryc. 11 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych ludzkiej linii typu NK (NK-92 = E) względem komórek docelowych psich linii nowotworowych (A: CLB70 = T, B: CLBL-1 = T, C: GL-1 = T). Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykresy ilustrują wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresach zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów.

4.3.3. Ocena wrażliwości psich komórek nowotworowych typu B na cytotoksyczność psich komórek PBMC (cPBMC) po 4 godzinach

Kolejny eksperyment został zaprojektowany z zamiarem oceny wrażliwości psich komórek nowotworowych typu B na zabijanie przez psie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (cPBMC). Wśród komórek cPBMC obecna jest frakcja psich komórek typu NK. Wybrano 3 linie psich białaczek/chłoniaków typu B: GL-1, CLBL-1 oraz CLB-70, służących jako komórki docelowe. Komórki inkubowano w układzie E:T przez 4 godziny, w stosunkach 1:1, 5:1, 10:1, 20:1. Jako kontroli eksperymentu użyto próbek zawierających wyłącznie komórki docelowe: GL-1, CLBL-1 lub CLB-70 wybarwione bCT.

Testowane linie komórek docelowych okazały się wrażliwe na zabijanie przez komórki cPBMC. Poziomy zabijania komórek docelowych różniły się pomiędzy osobnikami, od których pochodziła krew. Największą wrażliwością we wszystkich przypadkach cechowały się komórki GL-1, a cytotoksyczność wzrastała wraz ze wzrostem stosunku E:T. Komórki CLBL-1 oraz CLB-70 wykazywały zbliżoną wrażliwość na zabijanie przez komórki cPBMC (Ryc. 12).

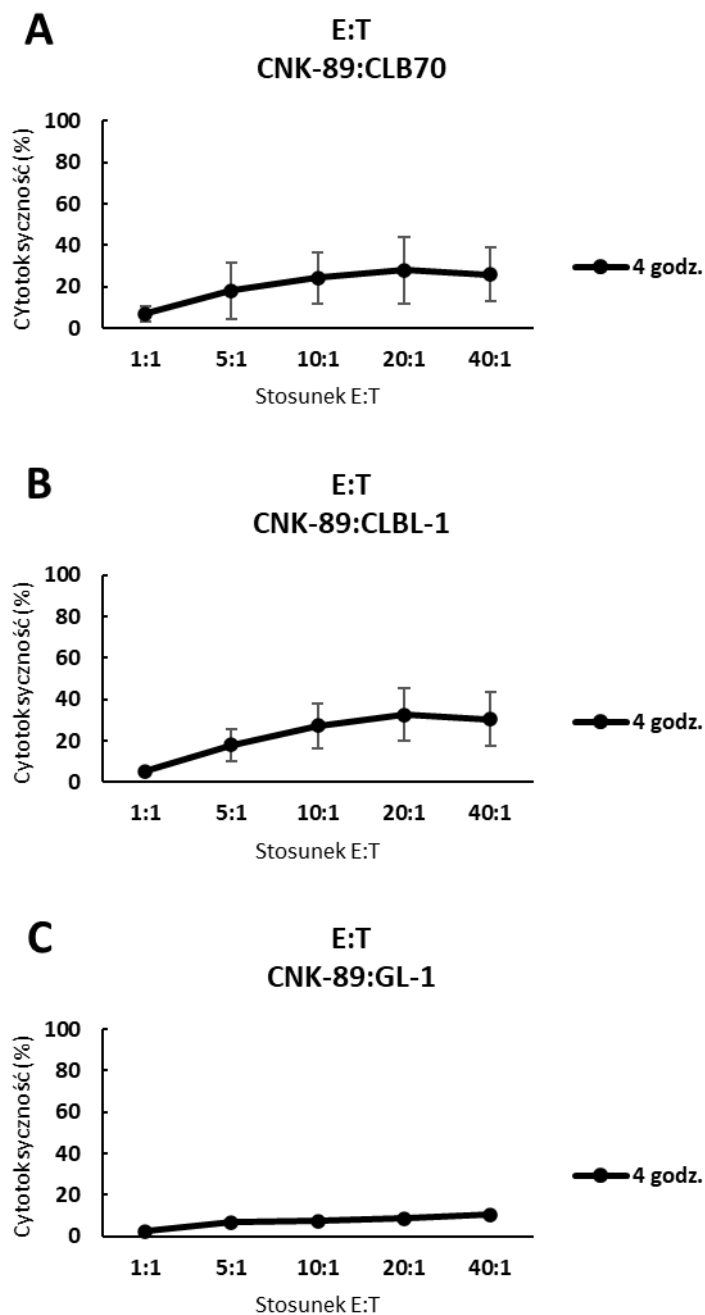


Ryc. 12 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych zawartych we frakcji psich komórek PBMC (cPBMC = E) względem komórek docelowych psich linii nowotworowych (A: CLB70 = T, B: CLBL-1 = T, C: GL-1 = T). Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbek zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykresy ilustrują wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Linie: niebieska, zielona i pomarańczowa reprezentują wartości uzyskane dla komórek izolowanych z krwi obwodowej poszczególnych psów.

4.3.4. Ocena cytotoksyczności komórek CNK-89 względem psich komórek nowotworowych typu B po 4 godzinach

Po udowodnieniu, że psie komórki wybranych linii białaczkowych są wrażliwe na zabijanie przez ludzką linię komórek NK oraz psie komórki cPBMC, przystąpiono do testowania właściwości cytotoksycznych psiej linii komórkowej CNK-89. Jako komórek docelowych użyto linii: GL-1, CLBL-1, CLB-70. Komórki inkubowano w układzie E:T przez 4 godziny, w stosunkach 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 40:1. Jako kontroli eksperymentu użyto próbek zawierających wyłącznie komórki docelowe: GL-1, CLBL-1 lub CLB-70 wybarwione bCT.

Po 4 godzinach inkubacji komórek efektorowych z docelowymi, komórki CNK-89 wykazały cytotoksyczność względem komórek CLBL-1 oraz CLB-70, natomiast brak właściwości cytotoksycznych względem linii GL-1 (Ryc. 13).

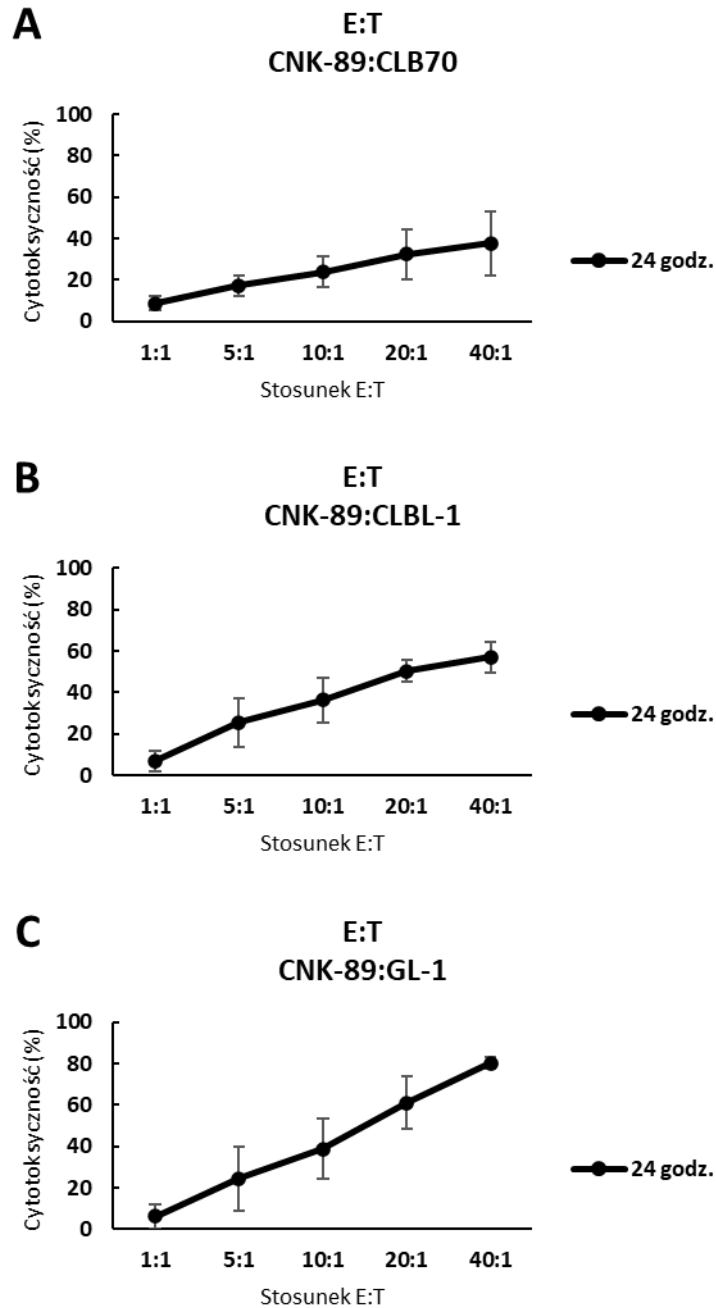


Ryc. 13 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK (CNK-89 = E) względem komórek docelowych psich linii nowotworowych (A: CLB70 = T, B: CLBL-1 = T, C: GL-1 = T). Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykresy ilustrują wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresach zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów.

4.3.5. Ocena cytotoksyczności komórek CNK-89 względem psich komórek nowotworowych typu B po 24 godzinach

Umiarkowana cytotoksyczność komórek CNK-89 względem komórek CLBL-1 i CLB-70 oraz brak cytotoksyczności względem komórek GL-1 po 4 godzinach wspólnej inkubacji skłoniły do sprawdzenia, czy wydłużenie czasu wzajemnej inkubacji do 24 godzin poprawi intensywność reakcji cytotoksycznej komórek CNK-89 względem wybranych linii psich nowotworów. W tym celu komórki docelowe wyznakowano barwnikiem bCT i połączono z komórkami CNK-89 w stosunkach 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 40:1. Komórki w takim układzie inkubowano przez 24 godziny. Jako kontroli eksperymentu użyto próbek zawierających wyłącznie komórki docelowe: GL-1, CLBL-1 lub CLB-70 wybarwione bCT.

Po 24 godzinach inkubacji cytotoksyczność komórek CNK-89 była widoczna względem wszystkich 3 linii, przy czym największa względem komórek GL-1. Poziom cytotoksyczności we wszystkich przypadkach był skorelowany z wysokością stosunku E:T (Ryc. 14).

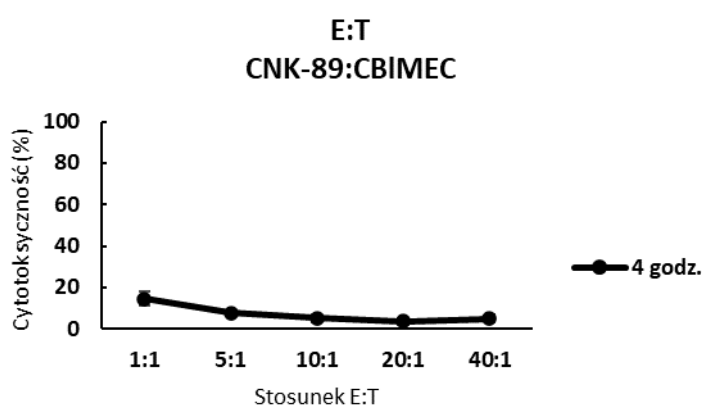


Ryc. 14 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK (CNK-89 = E) względem komórek docelowych psich linii nowotworowych (A: CLB70 = T, B: CLBL-1 = T, C: GL-1 = T). Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 24 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykresy ilustrują wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresach zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów.

4.3.6. Ocena cytotoksyczności komórek CNK-89 względem komórek psiego śródbłonka po 4 godzinach

Potencjał cytotoksyczny komórek NK jest wyjątkowo ceniony podczas prób projektowania terapii przeciwnowotworowej wykorzystującej te komórki. Podstawowym wymaganiem, jakie powinna spełniać nowoczesna terapia jest jej bezpieczeństwo względem prawidłowych komórek organizmu, w celu uniknięcia niepożądanych skutków ubocznych. Aby sprawdzić reakcję komórek CNK-89 wobec komórek prawidłowych, zdecydowano się na użycie psich komórek śródbłonka, pochodzącego ze zdrowego, psiego płodu (linia CBIMEC). Komórki śródbłonka w tym eksperymencie wybrano jednak nie tylko ze względu na ich prawidłową fizjologię, ale także z powodu ich roli bariery. Komórki NK w warunkach fizjologicznych migrują przez warstwę śródbłonka do miejsca, gdzie znajdują się komórki nowotworowe, zatem szczególnie ważne jest, by kontakt komórek NK oraz śródbłonka był dla wyściółki bezpieczny, jednak umożliwiając swobodną migrację. Komórki docelowe CBIMEC wyznakowano barwnikiem CT i połączono z komórkami CNK-89 w stosunkach 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 40:1. Komórki w takim układzie inkubowano przez 4 godziny. Jako kontroli eksperymentu użyto próbek zawierających wyłącznie komórki docelowe CBIMEC wybarwione CT.

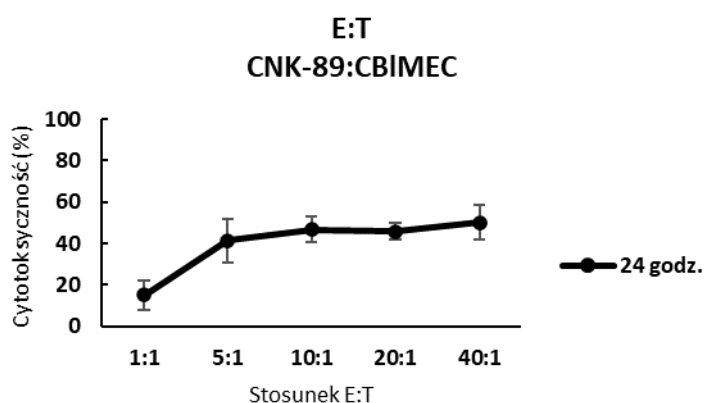
Wyniki eksperymentu pokazały, że po 4 godzinach inkubacji komórki CNK-89 wykazały minimalną cytotoksyczność względem komórek CBIMEC (Ryc. 15).



Ryc. 15 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK (CNK-89 = E) względem komórek docelowych psiej linii śródbłonka (CBIMEC = T). Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykres ilustruje wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresie zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów.

4.3.7. Ocena cytotoksyczności komórek CNK-89 względem komórek psiego śródbłonka po 24 godzinach

Układ CNK-89:CBIMEC postanowiono także inkubować przez 24 godziny, by sprawdzić, czy wydłużony czas wspólnej inkubacji wpłynie na żywotność komórek śródbłonka. Komórki docelowe CBIMEC wyznakowano barwnikiem bCT i połączono z komórkami CNK-89 w stosunkach 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 40:1. Komórki w takim układzie inkubowano przez 24 godziny. Jako kontroli eksperymentu użyto próbek zawierających wyłącznie komórki docelowe CBIMEC wybarwione bCT. Rezultatem badania była wyraźnie zwiększona śmiertelność komórek CBIMEC, wzrastająca gwałtownie już przy niskim stosunku E:T 5:1 (Ryc. 16).



Ryc. 16 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK (CNK-89 = E) względem komórek docelowych psiej linii śródbłonka (CBIMEC = T). Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 24 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykres ilustruje wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresie zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów.

4.4. Wpływ interleukin na właściwości cytotoksyczne komórek CNK-89

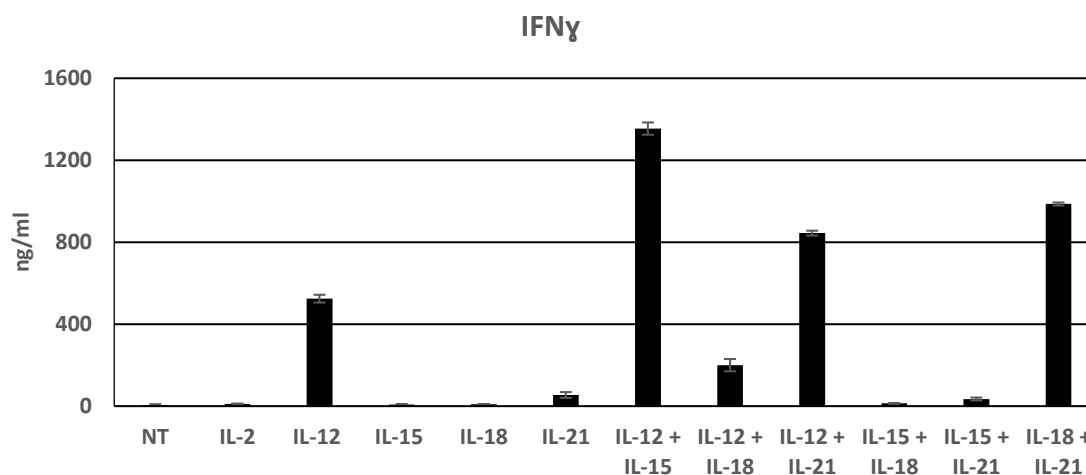
4.4.1. Stymulacja komórek CNK-89 interleukinami – oznaczenie wydzielania cytokin

4.4.1.1. Oznaczenie wydzielania IFN γ

Oznaczenie poziomu produkcji IFN γ traktowane jest jako jeden z markerów aktywacji limfocytów NK. Celem niniejszego eksperymentu było zbadanie, czy

traktowanie komórek CNK-89 wybranymi interleukinami wpływa na intensywność produkcji IFN γ przez te komórki.

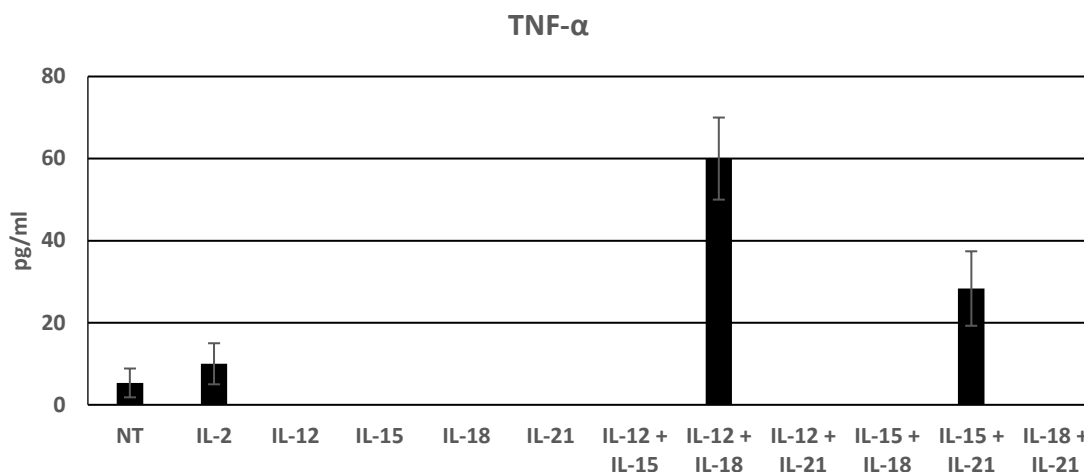
W stanie niepobudzonym (NT - nietraktowane) komórki CNK-89 nie wykazywały wydzielania IFN γ . Podobna sytuacja zaszła po traktowaniu IL-2, IL-15 oraz IL-18. Duży wzrost wydzielania IFN γ nastąpił natomiast po zastosowaniu IL-12 oraz jej kombinacji: IL-12 + IL-15, IL-12 + IL-18 oraz IL-12 + IL-21. Wysoki poziom IFN γ odnotowano także w przypadku użycia IL-18 + IL-21, natomiast pojedynczo cytokiny te nie wykazywały dużego wpływu na wzrost produkcji IFN γ (Ryc. 17).



Ryc. 17 Zawartość wydzielanego IFN γ w próbkach medium znad komórek CNK-89 nietraktowanych (NT) oraz traktowanych wybranymi interleukinami lub ich kombinacjami (każda IL w stężeniu 10 ng/ml) przez 48 godz. Wykres przedstawia uśrednioną zawartość IFN γ wraz z wartościami \pm SD .

4.4.1.2. Oznaczenie wydzielania TNF α

TNF α jest cytokiną wydzielaną przez komórki NK w momencie aktywacji, jednak w znacznie mniejszych ilościach, niż IFN γ . Celem niniejszego testu było sprawdzenie, czy traktowanie komórek CNK-89 wybranymi interleukinami ma wpływ na poziom wydzielania TNF α . Pomiar wykazały, że jedynie kombinacje IL-12 + IL-18 oraz IL-15 + IL-21 zwiększyły wydzielanie TNF α przez komórki CNK-89 (Ryc. 18).



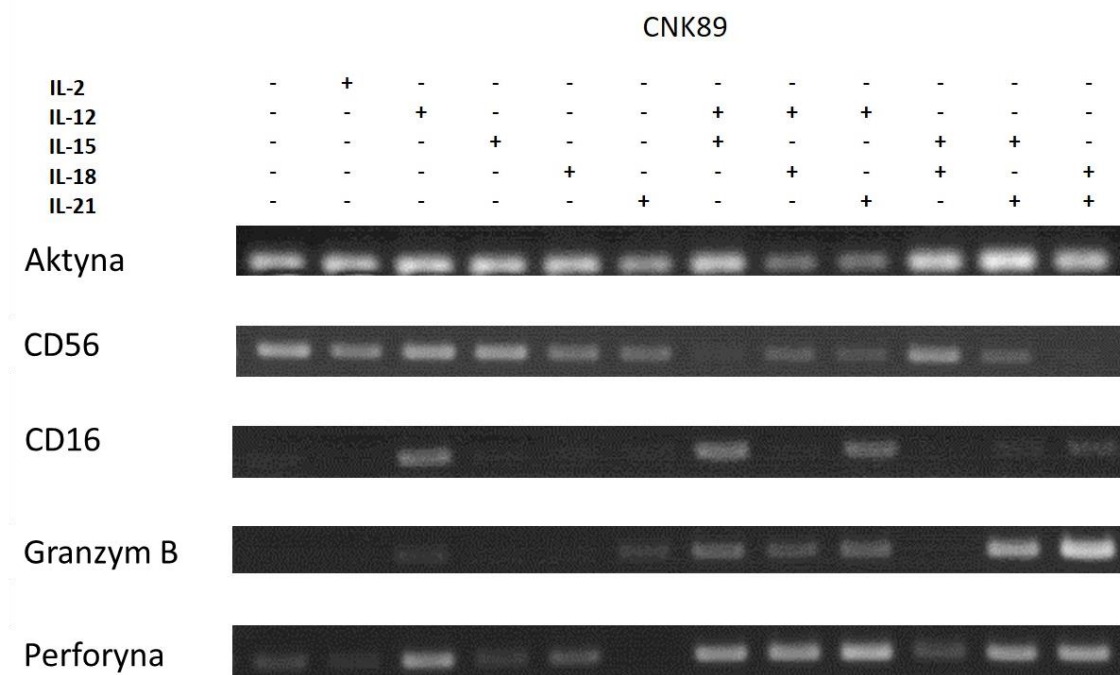
Ryc. 18 Zawartość wydzielanego TNF α w próbkach medium znad komórek CNK-89 nietraktowanych (NT) oraz traktowanych wybranymi interleukinami lub ich kombinacjami (każda IL w stężeniu 10 ng/ml) przez 48 godz. Wykres przedstawia uśrednioną zawartość TNF α wraz z wartościami \pm SD .

4.4.2. *Stymulacja komórek CNK-89 interleukinami – oznaczenie PCR*

Mając na uwadze właściwości aktywujące niektórych interleukin względem ludzkich komórek NK zdecydowano o traktowaniu komórek linii CNK-89 pojedynczymi interleukinami: IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 oraz ich kombinacjami: IL-12 + IL-15, IL-12 + IL-18, IL-12 + IL-21, IL-15 + IL-18, IL-15 + IL-21 oraz IL-18 + IL-21. Stężenie każdej interleukiny wynosiło 10 ng/ μ l, a komórki inkubowano przez 48 h w standardowych warunkach hodowli. Następnie oddzielono osad komórkowy od medium hodowlanego. Medium zamrożono do dalszych oznaczeń, a osad komórkowy zawieszono w TriReagent, wyizolowano RNA, przeprowadzono trawienie DNA, reakcję odwrotnej transkrypcji i reakcję PCR wykorzystując startery dla markerów CD56, CD16, granzymu B, perforyny oraz aktyny (kontrola pozytywna). Ponadto przeprowadzono także reakcję PCR ze starterami dla na matrycy RNA poddanej trawieniu DNA, niepoddanej reakcji odwrotnej transkrypcji, jako kontrolę negatywną wykluczającą zanieczyszczenie próbek genomowym DNA.

Traktowanie IL-2, IL-15 oraz IL-18 nie spowodowało zmian w poziomie transkryptu dla wszystkich badanych próbek, w porównaniu do kontroli. W tych próbkach wykryto jedynie mRNA dla CD56 oraz perforyny. IL-12 sama oraz w kombinacji z IL-15 i IL-21, a także kombinacja IL-18 + IL-21 doprowadziły do pojawiania się transkryptu dla markera CD16. Granzym B został uwidoczniiony również po traktowaniu IL-12 oraz jej

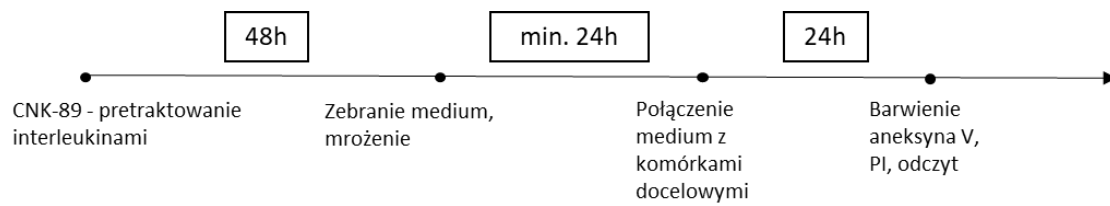
kombinacjami, a także po traktowaniach IL-21, IL-15 + IL-21 oraz IL-18 + IL-21 (Ryc. 19).



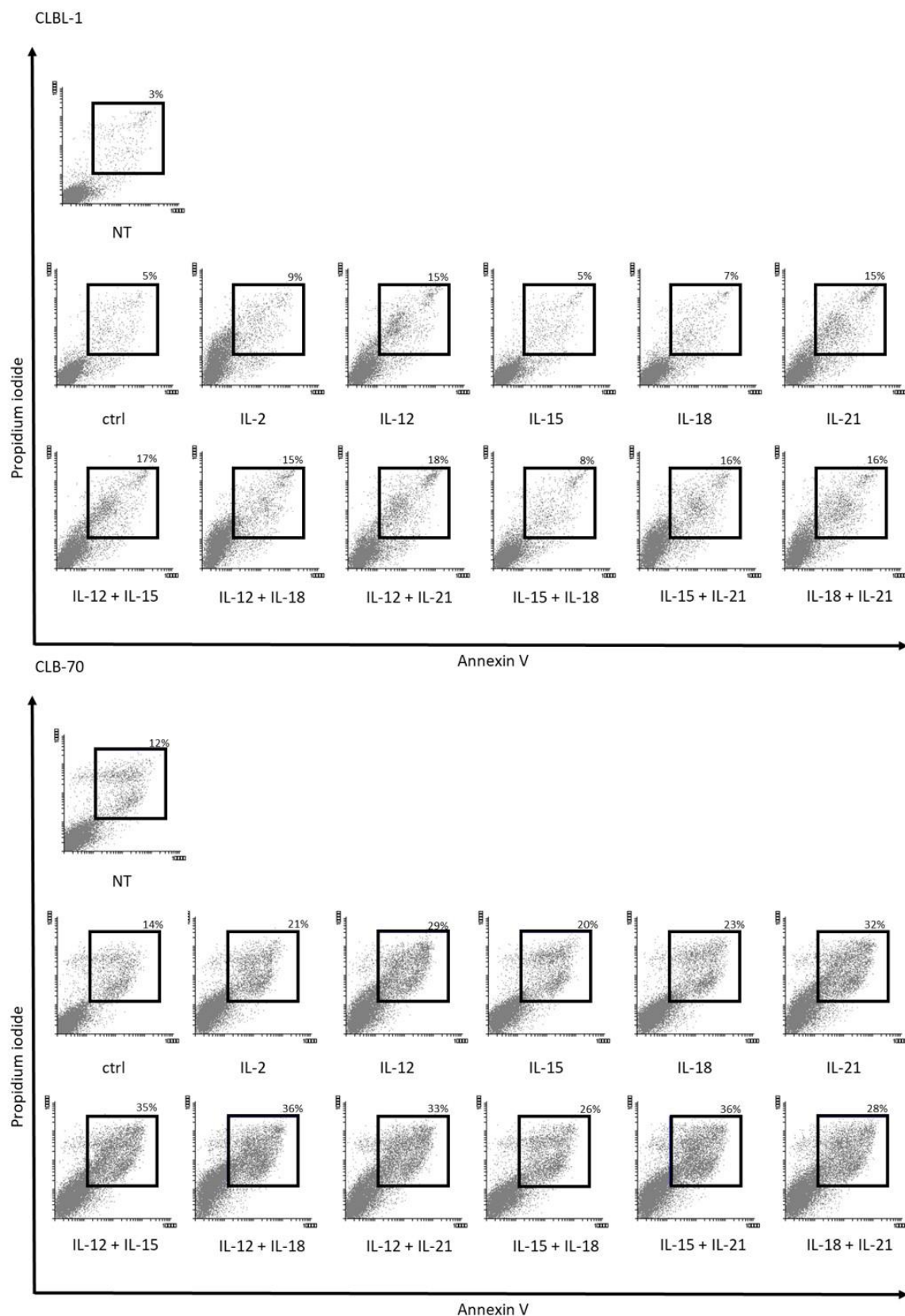
Ryc. 19 Zawartość mRNA w komórkach CNK-89 po traktowaniu wybranymi interleukinami oraz ich kombinacjami (każda IL w stężeniu 10 ng/ml) przez 48 godz. oceniona za pomocą reakcji RT-PCR i uwidoczniiona poprzez elektroforezę na żelu agarozowym. Rycina przedstawia reprezentatywny obraz żeli jednego z dwóch doświadczeń.

4.4.3. *Stymulacja komórek CNK-89 interleukinami – ocena cytotoksyczności medium*

Kolejnym krokiem w analizie właściwości cytotoksycznych komórek CNK-89 była ocena cytotoksyczności ich medium, po stymulacji interleukinami, wobec komórek docelowych. Przebieg eksperymentu został przedstawiony na Ryc. 20. W układzie tym nie zastosowano bezpośrednich interakcji pomiędzy komórkami efektorowymi CNK-89, a komórkami docelowymi. Wrażliwość na zabijanie przez cytotoksyczne składniki medium wykazały komórki CLB70 oraz CLBL-1 (Ryc. 21), natomiast komórki GL-1 pozostały niewrażliwe (nie pokazano). Największy efekt apoptotyczny wykazały próbki medium znad komórek CNK-89 traktowanych IL-12 oraz kombinacjami IL-12 + IL-15, IL-12 + IL-15, IL-12 + IL-21, aczkolwiek kontrole doświadczenia wykazały, że efekt cytotoksyczny próbek zawierających IL-21 spowodowany był działaniem samej interleukiny (nie pokazano). Zjawisko to nie było widoczne w przypadku innych interleukin.



Ryc. 20 Schemat eksperymentu oceniającego cytotoxycznosc medium z nad komórek CNK-89 traktowanych wybranymi interleukinami



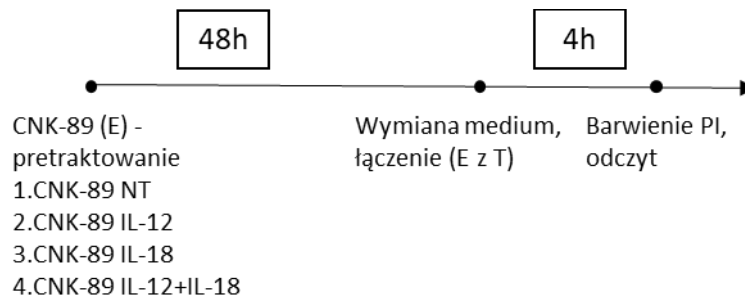
Ryc. 21 Aktywność cytotoksyczna medium z komórek NK wobec komórek docelowych CLBL-1 oraz CLB70. Komórki CNK-89 były preinkubowane z wybranymi interleukinami lub ich kombinacjami (każda IL w stężeniu 10 ng/ml) przez 48 godz., a następnie oddzielono od nich supernatant i dodano do komórek docelowych, inkubowano całość przez 24 godz., po czym liczbę komórek martwych oceniano przy pomocy testu Aneksyna V – PI. Próbkę NT to komórki

docelowe (CLBL-1 lub CLB-70) hodowane bez dodatku medium z komórek. Próbkę ctrl to komórki docelowe traktowane medium z komórek CNK-89 bez dodatku interleukin. Próbkę podpisane jako IL to komórki docelowe traktowane medium z komórek CNK-89 preinkubowanych z interleukinami. Rycina obrazuje reprezentatywne wykresy dotplot wykonane dla jednego z dwóch powtórzeń doświadczenia. Czarne kwadratowe bramki zawierają komórki podwójnie pozytywne (apoptotyczne). Kontrolę eksperymentu stanowiły próbki medium z odpowiednimi interleukinami (10 ng/ml), inkubowanymi przez 48 godz. bez udziału komórek CNK-89 w celu oceny, czy efekt cytotoksyczny wobec komórek docelowych nie jest wynikiem działania interleukin.

4.4.4. Stymulacja komórek CNK-89 interleukinami – wpływ na cytotoksyczność bezpośrednią CNK-89

4.4.4.1. Względem psich komórek białaczkowych

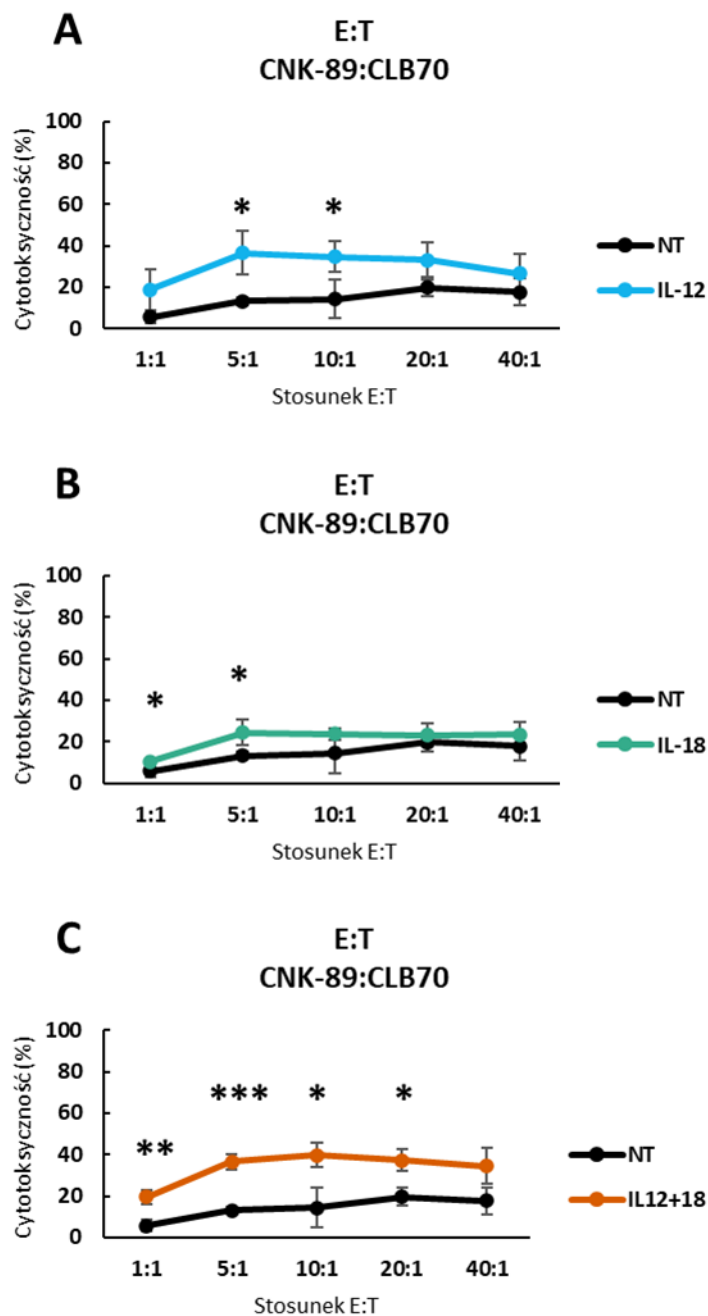
Kolejnym krokiem po określeniu właściwości cytotoksycznych komórek CNK-89 względem psich komórek białaczkowych było sprawdzenie, czy wybrane interleukiny, które zostały we wcześniejszych badaniach (punkty 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3) uznane jako stymulujące komórki CNK-89 będą w stanie podnieść poziom cytotoksyczności w teście cytotoksyczności bezpośredniej. Badania wstępne służące wybraniu najlepszej kombinacji wskazały na użycie zestawu IL-12 + IL-18 w stężeniu 10 ng/ul każda. Cytotoksyczność komórek CNK-89 po preinkubowaniu z interleukinami porównano z cytotoksycznością komórek CNK-89 nietraktowanych. Przebieg eksperymentu przedstawiono na Ryc. 22.



Ryc. 22 Schemat eksperymentu cytotoksyczności bezpośredniej komórek efektorowych CNK-89 (nietraktowanych i pretraktowanych wybranymi interleukinami) względem komórek docelowych

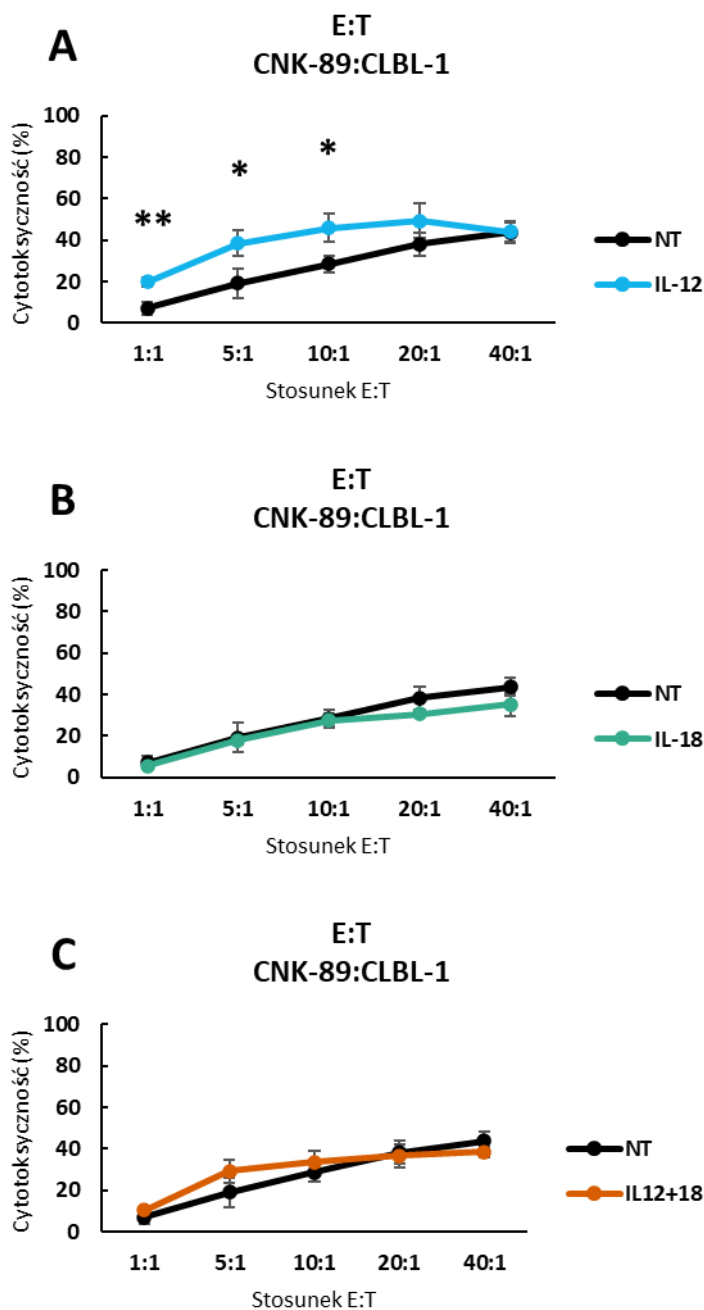
IL-12 aplikowana samodzielnie wykazała istotny statystycznie niewielki efekt stymulujący cytotoksyczność komórek CNK-89 względem linii docelowych w kilku pojedynczych stosunkach E:T (10:1 i 20:1 w przypadku linii GL-1, 10:1 w przypadku linii CLB-70 oraz 1:1, 5:1, 10:1 w przypadku linii CLBL-1). IL-18 aplikowana samodzielnie wykazała istotny statystycznie wzrost cytotoksyczności jedynie w przypadku linii CLB-70 i stosunków E:T 1:1 oraz 5:1. Preinkubacja komórek CNK-89 z kombinacją IL-12 + IL-18 znacząco poprawiło cytotoksyczność komórek CNK-89 względem komórek GL-1 oraz CLB-70, nie miało natomiast żadnego efektu na cytotoksyczność względem komórek

CLBL-1 (Ryc. 23, Ryc. 24, Ryc. 25). Dodatkowo, kombinacja IL-12 + IL-18 zwiększyła cytotoksyczność komórek CNK-89 względem komórek CBIMEC w przypadku stosunków 20:1 i 40:1 (Ryc. 26).



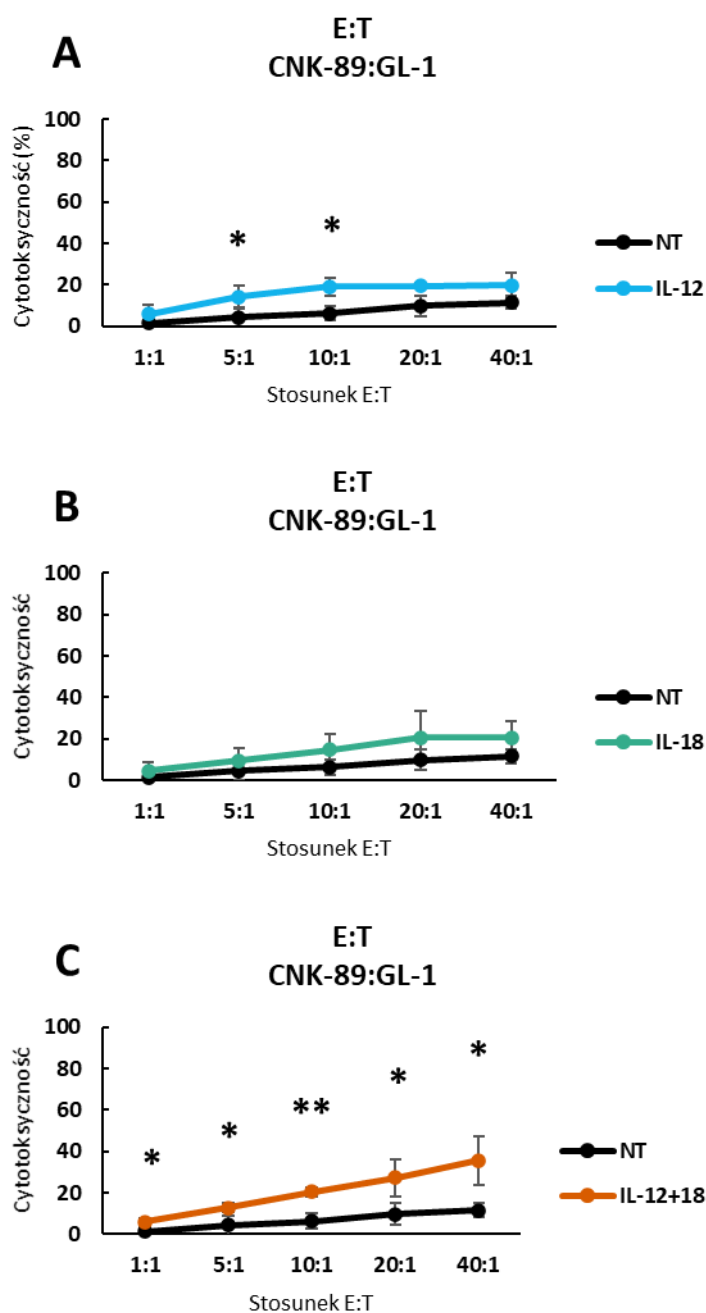
Ryc. 23 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK (CNK-89 = E) preinkubowanych z interleukinami oraz nietraktowanych względem komórek docelowych psiej linii nowotworowej (CLB70 = T). Komórki CNK-89 inkubowano z interleukinami (A: IL-12 10 ng/ml, B: IL-18 10 ng/ml, C: IL-12+IL-18 10 ng/ml każda) przez 48 godz., odpłukano interleukiny i rozpoczęto inkubację z komórami docelowymi. Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykresy ilustrują wartości %

cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresach zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów. Średnie wartości cytotoxyczności komórek efektorowych nietraktowanych (linia czarna, NT = nietraktowane) porównano z wartościami cytotoxyczności komórek preinkubowanych z interleukinami (linie kolorowe, A: IL-12, B: IL-18, C: IL-12+IL-18), istotność statystyczna wobec wartości dla komórek NT wyznaczono testem t-Student gdzie: * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.



Ryc. 24 Cytotoxyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK (CNK-89 = E) preinkubowanych z interleukinami oraz nietraktowanych względem komórek docelowych psiej linii nowotworowej (CLBL-1 = T). Komórki CNK-89 inkubowano z interleukinami (A: IL-12 10 ng/ml, B: IL-18 10 ng/ml, C: IL-12+IL-18 10 ng/ml każda) przez 48 godz., odpłukano interleukiny i rozpoczęto inkubację z komórami docelowymi. Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykresy ilustrują wartości % cytotoxyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresach

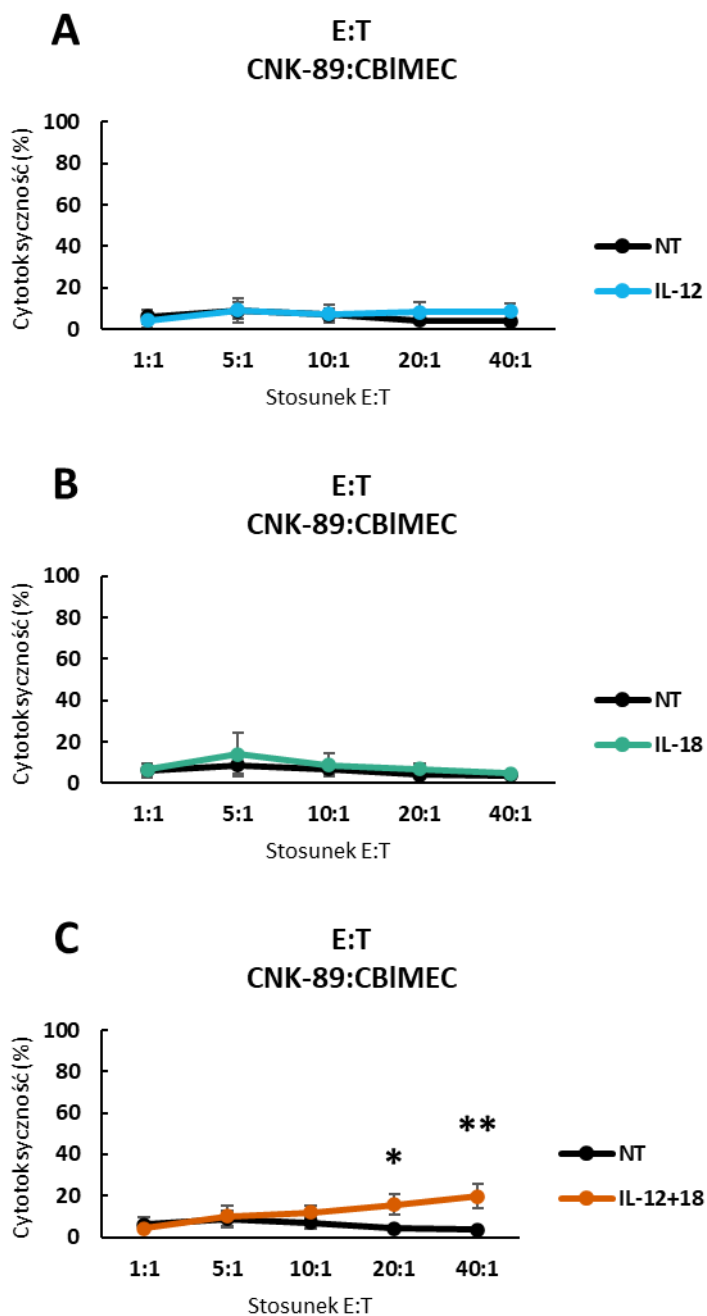
zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów. Średnie wartości cytotoksyczności komórek efektorowych nietraktowanych (linia czarna, NT = nietraktowane) porównano z wartościami cytotoksyczności komórek preinkubowanych z interleukinami (linie kolorowe, A: IL-12, B: IL-18, C: IL-12+IL-18), istotność statystyczna wobec wartości dla komórek NT wyznaczono testem t-Student gdzie: * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.



Ryc. 25 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK (CNK-89 = E) preinkubowanych z interleukinami oraz nietraktowanych względem komórek docelowych psiej linii nowotworowej (GL-1 = T). Komórki CNK-89 inkubowano z interleukinami (A: IL-12 10 ng/ml, B: IL-18 10 ng/ml, C: IL-12+IL-18 10 ng/ml każda) przez 48 godz., odpłukano interleukiny i rozpoczęto inkubację z komórami docelowymi. Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykresy ilustrują wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresach zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów. Średnie wartości cytotoksyczności komórek efektorowych

nietraktowanych (linia czarna, NT = nietraktowane) porównano z wartościami cytotoksyczności komórek preinkubowanych z interleukinami (linie kolorowe, A: IL-12, B: IL-18, C: IL-12+IL-18), istotność statystyczna wobec wartości dla komórek NT wyznaczono testem t-Student gdzie: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4.4.2. Względem psich komórek śródbłonna

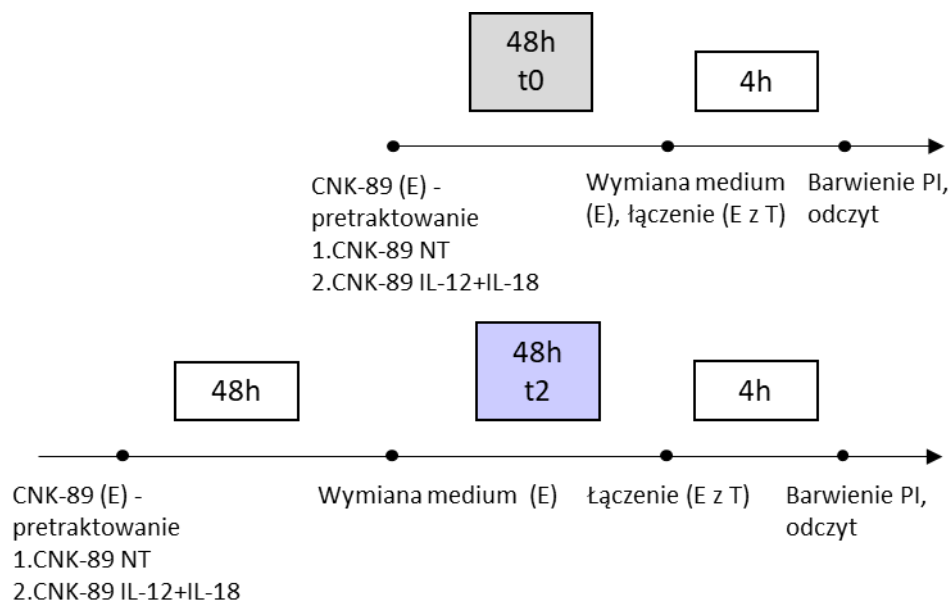


Ryc. 26 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK (CNK-89 = E) preinkubowanych z interleukinami oraz nietraktowanych względem komórek docelowych psiej linii śródbłonna (CBIMEC = T). Komórki CNK-89 inkubowano z interleukinami (A: IL-12 10 ng/ml, B: IL-18 10 ng/ml, C: IL-12+IL-18 10 ng/ml każda) przez 48 godz., odpłukano interleukiny i rozpoczęto inkubację z komórami docelowymi. Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu

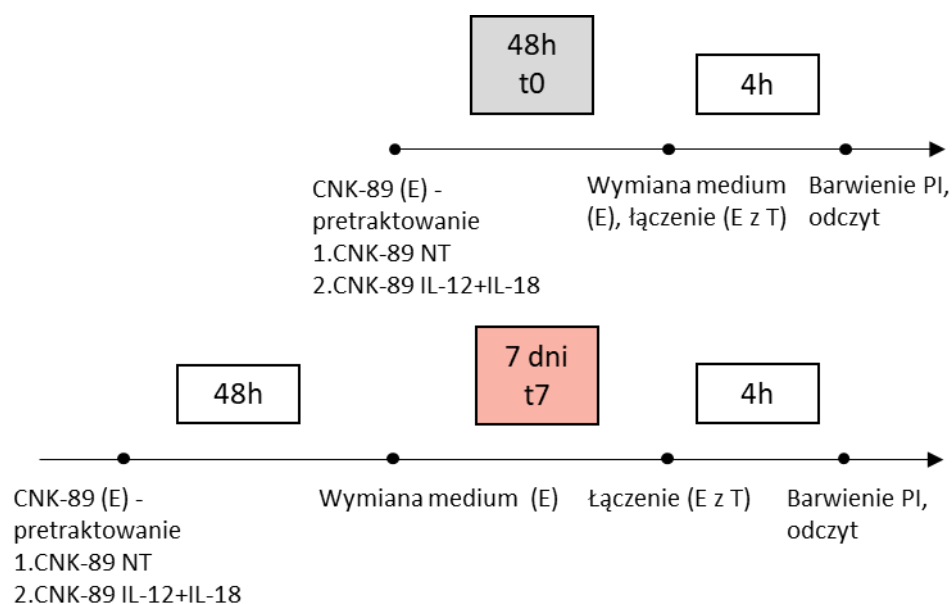
użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykresy ilustrują wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresach zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów. Średnie wartości cytotoksyczności komórek efektorowych nietraktowanych (linia czarna, NT = nietraktowane) porównano z wartościami cytotoksyczności komórek preinkubowanych z interleukinami (linie kolorowe, A: IL-12, B: IL-18, C: IL-12+IL-18), istotność statystyczna wobec wartości dla komórek NT wyznaczono testem t-Student gdzie: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4.5. Długoterminowy wpływ interleukin na cytotoksyczność CNK-89

Kolejnym krokiem w badaniu wpływu wybranych interleukin na cytotoksyczność komórek CNK-89 było sprawdzenie, czy efekt ten powoduje stabilny w czasie wzrost cytotoksyczności komórek CNK-89. Upřednio sprawdzano efekt stymulujący bezpośrednio po usunięciu interleukin z układu eksperymentalnego, dlatego w następnej części zdecydowano się na pomiar cytotoksyczności 2 oraz 7 dni po usunięciu czynnika stymulującego komórki CNK-89. Do tego testu wybrano jedną linię komórek docelowych: GL-1, ponieważ dla tych komórek wzrost efektu cytotoksycznego po stymulacji cytokinami widoczny był we wszystkich stosunkach E:T. Cytotoksyczność komórek CNK-89 preinkubowanych z interleukinami mierzona w dniu usunięcia cytokin z układu (t_0) porównano z cytotoksycznością komórek CNK-89 preinkubowanych z interleukinami mierzona 2 dni (t_2) oraz 7 dni (t_7) po usunięciu cytokin z układu. Przebieg eksperymentu przedstawiono na Ryc. 27 i Ryc. 28.

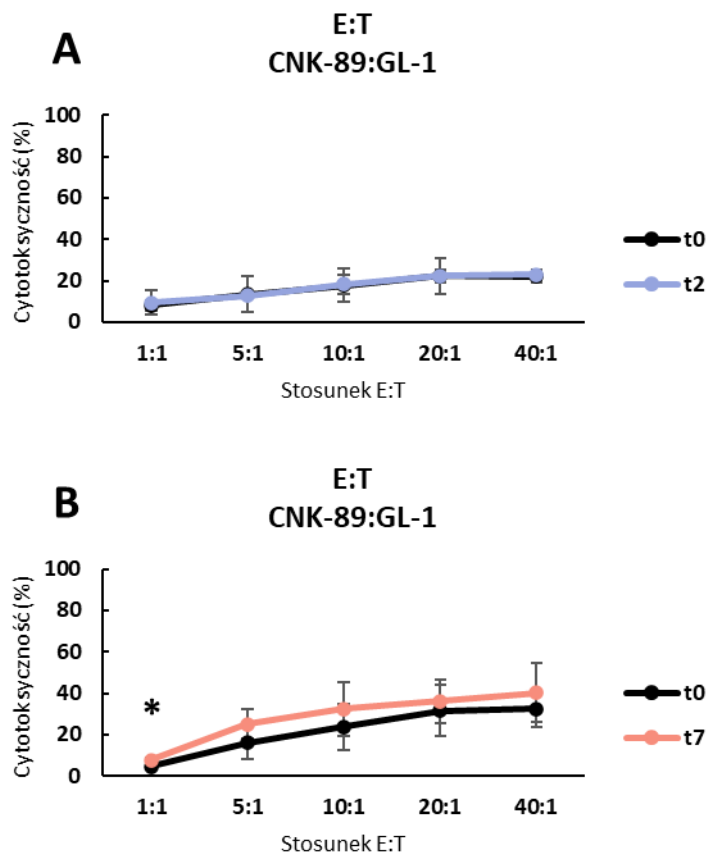


Ryc. 27 Schemat eksperymentu obejmującego wpływ wybranych interleukin na cytotoksyczność komórek CNK-89 bezpośrednio po zakończeniu traktowania oraz 2 dni po zakończeniu traktowania



Ryc. 28 Schemat eksperymentu obejmującego wpływ wybranych interleukin na cytotoksyczność komórek CNK-89 bezpośrednio po zakończeniu traktowania oraz 7 dni po zakończeniu traktowania

Cytotoksyczność komórek CNK-89 w czasie t0 oraz t2 była taka sama, a po czasie t7 nieco wyższa, niż w czasie t0, chociaż nie była to różnica istotna statystycznie. Wyniki te wskazują, że efekt stymulujący cytotoksyczność wywierany na komórki CNK-89 jest stabilny po 2 oraz 7 dniach po pozbawieniu komórek CNK-89 cytokin (Ryc. 29).



Ryc. 29 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK (CNK-89 = E) A: preinkubowanych z interleukinami (IL-12 + IL-18, 10 ng/ml każda przez 48 godz.) po 2 dniach od usunięcia interleukin z układu (t2) porównanych z cytotoksycznością komórek NK preinkubowanych z interleukinami i pozbawionych interleukin w dzień przeprowadzenia eksperymentu (t0) oraz B: preinkubowanych z interleukinami po 7 dniach od usunięcia interleukin z układu (t7) porównanych z cytotoksycznością komórek NK preinkubowanych z interleukinami i pozbawionych interleukin w dzień przeprowadzenia eksperymentu (t0) względem komórek docelowych psiej linii nowotworowej (GL-1 = T). Komórki efektorowe inkubowano z docelowymi (wybarwionymi barwnikiem bCT) w odpowiednich stosunkach E:T przez 4 godz., a następnie wszystkie komórki barwiono jodkiem propidyny i analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Jako kontroli eksperymentu użyto próbki zawierającej wyłącznie komórki docelowe (spontaniczna śmierć). Wykresy ilustrują wartości % cytotoksyczności komórek efektorowych wobec komórek docelowych w wybranych stosunkach E:T. Na wykresach zaznaczono wartości \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów. Średnie wartości cytotoksyczności komórek efektorowych w czasie t0 (linia czarna) porównano z wartościami cytotoksyczności komórek preinkubowanych z interleukinami w czasie t2 (A) oraz w czasie t7 (B), istotność statystyczna wobec wartości dla komórek NT wyznaczono testem t-Student gdzie: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5. Dyskusja

Pies, jako zwierzę towarzyszące człowiekowi, narażony jest na takie same, niekorzystne działanie czynników środowiskowych, co jego właściciel. Co więcej, badania pokazują, że w przypadku wielu rodzajów chorób nowotworowych, w tym białaczek i chłoniaków, przyczyny powstawania choroby, jej rozwój i przebieg wykazują duże podobieństwo pomiędzy organizmem ludzkim i psim, co czyni psa dogodnym modelem do badań w tej materii³. W porównaniu do często stosowanego modelu mysiego, pies ma tę przewagę, że wykazuje więcej podobieństw do człowieka, zarówno w anatomii, fizjologii, długości życia, a także w kwestii rozwoju fenotypu chorobowego. Badania toksykologiczne na psach są ważnym etapem w ocenie bezpieczeństwa leków o docelowym przeznaczeniu terapeutycznym dla ludzi, zatem właściwym podejściem wydaje się również próba przeniesienia terapii skutecznych w leczeniu nowotworów ludzkich do weterynarii, jako, że psy będące zwierzętami towarzyszącymi człowiekowi również zasługują na dostęp do efektywnych metod leczenia.

Obecnie dużym zainteresowaniem w kwestii leczenia nowotworów u ludzi cieszą się immunoterapie, czyli podejścia lecznicze wykorzystujące stymulację układu odpornościowego organizmu w celu wydajniejszego eliminowania komórek nowotworowych. Jednym z rodzajów immunoterapii są podejścia oparte na użyciu komórek typu NK – limfocytów mających zdolność do zabijania komórek nowotworowych oraz zainfekowanych wirusem, bez konieczności uprzedniej immunizacji. Terapie te okazują się wyjątkowo skuteczne w przypadku eliminacji nowotworów układu krwiotwórczego – białaczek i chłoniaków, między innymi z powodu wywołania odpowiedzi przeszczep przeciw nowotworowi⁷⁷. Dostępność kilku ludzkich linii komórek typu NK^{78,79} oraz dobra znajomość ich biologii i właściwości pozwalają na tworzenie coraz bardziej wyrafinowanych procedur leczniczych, często wykorzystujących także przeciwciała (np. terapia na bazie ADCC⁸⁰) czy modyfikacje genetyczne limfocytów. W przypadku psów sprawa jest utrudniona – zarówno z powodu braku jednoznacznej definicji fenotypu psich komórek typu NK, jak i niedostępności stabilnej psiej linii komórkowej typu NK. Badania składające się na niniejszą rozprawę miały na celu dokładne scharakteryzowanie komórek, które po wstępnej charakterystyce wykazywały cechy komórek typu NK.

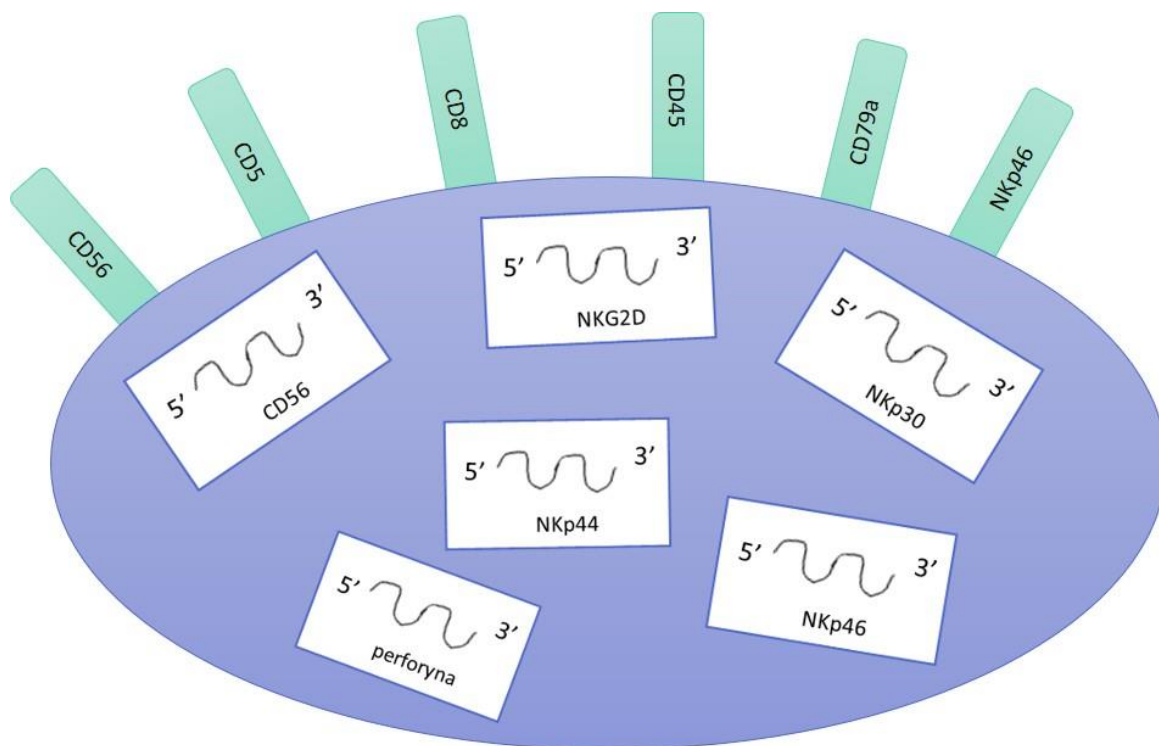
Nasze laboratorium przy współpracy z przychodnią weterynaryjną NeoVet oraz Katedrą Farmakologii i Toksykologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

wyprowadziło linię komórkową na bazie materiału pobranego od psa cierpiącego na nieznaną rozrost limfoidalny. Analiza niekontrolowane namnażającej się populacji komórkowej wykazała obecność komórek o cechach fenotypowych i funkcjonalnych wskazujących na populację limfocytów NK.

Rozmaz komórek NK wybarwionych HE oraz metodą MGG porównano z opisem komórek LGL przygotowanym przez American Society of Hematology (ASH)⁸¹. W komórkach CNK-89 cytoplazma barwiła się na jasnoniebieski kolor, jednak na zdjęciach nie było możliwe wykrycie wyraźnych granul azurofilnych. Istnieje możliwość, że wyraźne granule w komórkach CNK-89 formują się dopiero w momencie aktywacji tych komórek. Taką ewentualność sugerować mogą badania poziomu transkryptu dla granzymu B (składnika granul). W komórkach CNK-89 w stanie spoczynkowym nie zidentyfikowano obecności mRNA dla granzymu B, był on natomiast widoczny po aktywacji niektórymi interleukinami. Badania morfologiczne komórek CNK-89 mogłyby zostać zatem wzbogacone o obraz komórek aktywowanych oraz o zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego. W obrazie mikroskopowym widoczne było charakterystyczne, duże jądro komórkowe zabarwione na fioletowo, o owalnym kształcie, co jest zgodne z wytycznymi ASH dla komórek LGL.

Na początku badań, po ustanowieniu stabilnej linii komórkowej, kluczowe było zdefiniowanie fenotypu komórek. Badania cytometryczne wykazały obecność markerów CD5, CD8, CD45, CD56, CD79a oraz NKp46, natomiast nieobecność CD3, CD4, CD14, CD20, CD21, CD34, MHC II, Thy-1, IgG oraz IgM. Wyniki dotyczące fenotypowania psich komórek NK przedstawione przez inne grupy badawcze dopuszczały możliwość wystąpienia cząsteczki CD5¹⁷ oraz CD8²⁸ na tych limfocytach, zatem wynik ten jest zgodny z aktualnym stanem wiedzy. Ponadto, psie komórki NK definiuje się jako nie posiadające cząsteczek CD3 oraz CD4 charakterystycznych dla populacji limfocytów T oraz cząsteczek CD20, CD21, IgG i IgM typowych dla komórek typu B, co także potwierdzają wyniki z niniejszej pracy, aczkolwiek obecność markera CD45 wskazuje na to, że mimo braku fenotypu komórek T oraz B, komórki CNK-89 należą do populacji leukocytów. Interesująco przedstawia się sytuacja z markerem CD79a, bowiem jest on identyfikowany głównie w komórkach typu B, jednak w literaturze można znaleźć doniesienie o jego obecności w komórkach pochodzących od chłoniaków komórek typu NK oraz T⁸². Ponadto, opisano także populację zdrowych komórek progenitorowych linii B, pozytywnych względem markera CD79a, mogących również różnicować się do komórek NK⁸³. Kontrowersyjna wydaje się natomiast kwestia cząsteczki CD56, która w przypadku

komórek ludzkich NK jest podstawowym markerem fenotypu tej populacji, a w przypadku komórek psich NK nie została zidentyfikowana jako białko powierzchniowe. Fenotypowanie linii CNK-89, wykazało zarówno obecność transkryptu, jak i występowanie cząsteczki powierzchniowej CD56, jednak należy mieć na uwadze pochodzenie materiału wyjściowego, z którego wyprowadzona została linia CNK-89 (płyn opłucnowy), natomiast większość badań nad psimi komórkami NK bazowała na krwi obwodowej jako materiale podstawowym. mRNA cząsteczki CD56 nie wykryto natomiast w psiej krwi obwodowej ani w komórkach śledziony, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi w literaturze^{15,16}. W komórkach CNK-89 nieaktywowanych nie wykryto także transkryptu CD16 identyfikowanego z kolei w pracach innych Autorów^{17,23}. Co ciekawe, w eksperymentach tego typu identyfikacja transkryptu CD16 korelowała z brakiem transkryptu dla markera CD56. Biorąc pod uwagę klasyfikację ludzkich komórek NK na podstawie poziomów ekspresji markerów CD56 oraz CD16 można wysnuć wniosek, że w przypadku komórek psich możliwa jest podobna sytuacja. Populacja psich komórek NK z krwi obwodowej cechująca się wykrywalnym poziomem transkryptu dla markera CD16 i brakiem markera CD56 może być dojrzałą frakcją populacji komórek NK, jaką reprezentuje linia CNK-89, w której obecny jest marker CD56, a nieobecny marker CD16. Dowody na poparcie tej tezy mogłyby przynieść badania transkryptów techniką Real-Time PCR porównujące linię CNK-89 z komórkami NK izolowanymi z innych źródeł: krwi obwodowej, śledziony czy szpiku kostnego. Dużym ułatwieniem byłoby także użycie przeciwciała do cytometrii przepływowej rozpoznającego psie białko CD16, które obecnie jest komercyjnie niedostępne. Oprócz analizy cytometrycznej, ważne wyniki przyniosła też analiza obecności transkryptów dla receptorów aktywujących komórki NK: NKG2D, NKp30, NKp44 oraz NKp46. W linii CNK-89 wszystkie te markery zostały zidentyfikowane w formie mRNA, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Lee i współpracowników²³. Wyniki fenotypowania komórek CNK-89 zostały podsumowane na Ryc. 30.



Ryc. 30 Częsteczki zidentyfikowane na powierzchni komórek CNK-89 przy pomocy cytometrii przepływowej (zielone obiekty) oraz transkrypty w komórkach CNK-89 zidentyfikowane przy pomocy metody RT-PCR (białe obiekty).

Badania dotyczące cytotoksyczności bezpośredniej przeprowadzone były przy użyciu cytometrii przepływowej, opracowując metodę barwienia komórek docelowych przy użyciu nietoksycznego i nieradioaktywnego barwnika fluorescencyjnego. Metoda optymalizowana była przy wykorzystaniu ludzkich linii komórkowych typu NK – NK-92 o dobrze opisanych właściwościach cytotoksycznych w literaturze oraz białaczkowej K562, wrażliwej na zabijanie przez limfocyty NK^{84,85}. Opracowana na potrzeby niniejszej pracy metoda pozwoliła na sprawdzenie wrażliwości wybranych komórek docelowych na zabijanie przez komórki NK. Do badań wybrano 3 psie linie typu białaczka/chłoniak B-komórkowy jako linie docelowe dla komórek cytotoksycznych, ponieważ w literaturze nie opisano badań wykorzystujących tego typu modelu w testach cytotoksyczności psich komórek NK. Komórki te wydają się obiecującym celem dla komórek NK w związku ze skutecznością ludzkich terapii wykorzystujących cytotoksyczność komórek NK wobec komórek układu hematopoetycznego. Ponadto, białaczki i chłoniaki stanowią znaczną część nowotworów psich³, zatem właściwym podejściem jest skupienie się przede wszystkim na leczeniu bardziej powszechnych schorzeń. Po etapie optymalizacji metody przystąpiono do właściwych badań oceniających cytotoksyczność ludzkich komórek NK-

92 względem wybranych psich linii komórek białaczkowych. Komórki NK-92 wykazały silną cytotoksyczność względem komórek CLBL-1, CLB-70 oraz GL-1, co jest zgodne z wynikami opublikowanymi przez Addissie i Klingemanna⁴⁰. Badacze ci wykazali wysoką cytotoksyczność komórek NK-92 względem kilku linii psich komórek nowotworowych. Dla porównania, w badaniach wspomnianej grupy, cytotoksyczność psich NK izolowanych z krwi obwodowej względem tych samych linii była znacznie niższa, natomiast w przypadku badań zawartych w tej pracy, cytotoksyczność psich komórek cPBMc względem linii CLBL-1, CLB-70 oraz GL-1 była porównywalna do tej, którą wykazały komórki NK-92 względem tych linii. Rozbieżności w aktywności psich komórek NK w badaniach Addissie i Klingemanna, a cPBMc użytych w niniejszej pracy można tłumaczyć inną procedurą przygotowania komórek efektorowych, a także inną charakterystyką linii docelowych użytych w obydwu schematach eksperymentalnych. Doświadczenia te pozwoliły na ustalenie panelu 3 linii psich komórek nowotworowych o fenotypie komórek B służących jako linie docelowe w testach cytotoksyczności psich komórek typu NK, mające dodatkowo zaletę wzrostu w zawieszynie, co znacznie ułatwia procedury eksperymentalne i pozwala na ominięcie etapu trypsynizacji, koniecznej w przypadku komórek adherentnych, Do tej pory w literaturze przeważająca liczba badań skupiała się na użyciu linii CTAC jako linii docelowej (Tab.1), co z jednej strony pozwoliło na dokładniejsze scharakteryzowanie jej właściwości w tego typu testach, jednak takie podejście jest też z punktu widzenia projektowania nowych terapii ograniczające z racji faktu, iż linia CTAC pochodzi z określonego typu nowotworu litego (nowotwór tarczycy), a przy testowaniu nowych podejść terapeutycznych korzystne jest także sprawdzenie ich skuteczności w przypadku innych typów nowotworów. Prace z ostatnich lat pokazują, że testy cytotoksyczności oparte niegdyś głównie na linii CTAC jako docelowej, obejmują wprowadzanie kolejnych linii, np. OSCA-78²⁴, BW KOS⁴⁰ czy CF41⁴⁰, jednak mimo wszystko są to komórki z nowotworów litych, za wyjątkiem użycia linii CL-1 (chłoniak T-komórkowy) przez grupę badaczy z Japonii^{39,42}. Mając na uwadze te dane, panel 3 linii zaproponowany w niniejszej pracy doskonale uzupełnia lukę w kwestii badań cytotoksyczności psich komórek typu NK względem psich komórek białaczkowych.

Oprócz właściwości fenotypowych charakterystycznych dla komórek NK, linia CNK-89 wykazała także właściwości cytotoksyczne względem komórek nowotworowych. Linie CLBL-1 oraz CLB-70 poddawały się aktywności cytotoksycznej komórek CNK-89 po 4 i 24 godzinach, natomiast w przypadku komórek GL-1 dopiero po 24 godzinach wspólnej inkubacji został uzyskany efekt lizy, aczkolwiek po tym czasie był on najwyższy

spośród 3 badanych linii. Jak opisano powyżej, fenomen dotyczący linii GL-1 nie został zidentyfikowany w przypadku użycia NK-92 ani cPBMC jako efektorów, co świadczy o istnieniu odpowiedniego układu receptor-ligand pomiędzy komórkami GL-1, a NK-92/cPBMC, którego aktywacja potrafi zainicjować szybki, 4-godzinny mechanizm cytotoxyczości. Wytłumaczenie tego zjawiska zdecydowanie wymaga dalszych badań nad właściwościami zarówno linii GL-1, jak i CNK-89. Inne badania wskazują, że komórki GL-1 wykazują oporność w niektórych podejściach terapeutycznych⁸⁶. Najważniejszym wnioskiem płynącym jednak z tych eksperymentów jest ustanowienie i scharakteryzowanie psiej linii komórkowej typu NK, CNK-89, wykazującej zarówno właściwości fenotypowe, jak i funkcjonalne, specyficzne dla limfocytów typu natural killer. Niestety, komórki CNK-89 po 24 godz. wykazywały przy dużym nadmiarze cytotoxyczość względem prawidłowych komórek psiego śródbłoka, CBIMEC, zatem mając na uwadze ten wynik, wskazane byłyby dodatkowe testy mające na celu ocenę cytotoxyczości komórek CNK-89 względem komórek CBIMEC w warunkach przepływu z zastosowaniem barier typu Transwell naśladujących warunki, w jakich bytują komórki w organizmie.

Testy z użyciem interleukin zawarte w niniejszej rozprawie również przyniosły interesujące wyniki. Zaskoczenie budzi brak aktywności IL-2 w procesie aktywacji komórek CNK-89. Większość do tej pory scharakteryzowanych ludzkich linii komórkowych typu NK (np. NK-92, HANK1, KHYG-1⁷⁸) wymagała dodatku IL-2 do hodowli komórkowej w celu utrzymania prawidłowej kondycji i odpowiedniego poziomu proliferacji tych limfocytów. Cytokina ta jest także często używana podczas ekspansji psich komórek NK izolowanych z krwi obwodowej^{14,25}, zatem niewątpliwie pełni ona ważną rolę w biologii komórek NK, jednak przykład linii CNK-89, a także wcześniej opisana ludzka linia YT⁸⁷ pokazują, że jest możliwe ustanowienie linii komórek typu NK niezależnej w hodowli od IL-2, bez konieczności modyfikowania genetycznie takiej linii. Fenomen ten można spróbować wyjaśnić na kilka sposobów. Po pierwsze, w procesie dojrzewania komórek NK, IL-2 wspiera konwersję dojrzałych komórek NK w komórki o właściwościach cytotoxycznych⁸⁸, zatem komórki CNK-89 mogą być po prostu na etapie różnicowania, który ma miejsce przed przejściem w etap komórek dojrzałych i przez to być na IL-2 niewrażliwe, co nie wyklucza odpowiedzi CNK-89 na inne interleukiny, co też zostało w niniejszej rozprawie udowodnione. Ponadto, w komórkach CNK-89 mogła zajść mutacja w obrębie genu kodującego specyficzną podjednostkę receptora dla IL-2, co spowodowało niewrażliwość na sygnaling promowany przez tę cytokinę. Jednocześnie, z racji faktu, iż komórki CNK-89 są pochodzenia nowotworowego, mogła zajść aktywacja

innej ścieżki sygnałowej lub defekt powodujący nieustanną aktywację sygnalingu IL-2 niewymagający obecności tej cytokiny. Badania ukierunkowane na kwestię receptora dla IL-2 w komórkach CNK-89 powinny przynieść więcej informacji na ten temat. Finalnie, należy też mieć na uwadze pochodzenie komórek CNK-89. Limfocyty te były wyizolowane z płynu opłucnowego, a nie z krwi obwodowej, jak to zwykle ma miejsce w przypadku badanych komórek NK. Mimo, że badania przeprowadzone przez Vacca ze współpracownikami wykazały iż ludzki płyn opłucnowy był zasobny w komórki NK wrażliwe na stymulację IL-2⁸⁹, nie można kompletnie wykluczyć odmiennej sytuacji w przypadku psich organizmów bez dalszych badań. Niezależność od IL-2 w hodowli jest bez wątpienia zaletą linii komórkowej CNK-89 z kilku powodów. IL-2 jest związkami niestabilnym w medium i wymaga regularnego aplikowania jej do środowiska hodowlanego z racji jej rozkładu, co rzecz jasna generuje koszty oraz komplikuje nieco procedurę hodowlaną. Ponadto, linia CNK-89 jest dzięki temu doskonałym modelem do szybkiego i wygodnego testowania właściwości związków aktywujących komórki NK, np. witamin czy lektyn³³, ponieważ nie zajdzie wtedy interferencja pomiędzy aktywnością związku badanego, a IL-2, co bez wątpienia fałszuje wyniki pomiarów dotyczących pojedynczych związków. Wygodną właściwością linii CNK-89 jest także relatywnie krótki czas podziału (ok. 26 godzin), w przeciwieństwie do linii NK-92 (ok. 32 godziny⁹⁰), co pozwala szybko uzyskać duże ilości komórek do testów przesiewowych. Dodatkową zaletą linii CNK-89 jest możliwość szybkiego wzrostu w różnego rodzaju naczyniach do hodowli komórek ssaczy – butelkach, szalkach Petriego czy płytkach 6-dołkowych, w odróżnieniu do ludzkiej linii NK-92, preferującej wzrost na płytkach 6-dołkowych. Użycie IL-12 + IL-18 jest znane w literaturze dotyczącej komórek NK jako kombinacja aktywująca te limfocyty w sposób synergiczny⁹¹⁻⁹³ i takie też zjawisko zaobserwowano w testach będących częścią niniejszej rozprawy. Na początku wykazano przede wszystkim, iż IL-12 (sama oraz w kombinacjach) działa stymulująco na wydzielanie IFNy w komórkach CNK-89. Następnie zaobserwowano, że IL-12 oraz jej kombinacje aktywują transkrypcję genu granzymu B oraz CD16. Rolę IL-12 w aktywacji komórek CNK-89 potwierdziły także testy skupiające się na właściwościach cytotoksycznych medium znad psich komórek NK traktowanych tą cytokiną. Mając na uwadze te wyniki, zdecydowano się na dalsze badania skupiające się na funkcjonowaniu tej interleukiny w kontekście bezpośredniej cytotoksyczności komórek CNK-89. Preinkubacja komórek CNK-89 IL-12 lub IL-18 nie wykazała zbyt dużego wpływu stymulującego bezpośrednią cytotoksyczność tych komórek

względem psich komórek białaczkowych, natomiast zastosowanie kombinacji IL-12 + IL-18 zwiększyło znacząco cytotoksyczność efektorów względem linii GL-1 oraz CLB70.

Wzrost cytotoksyczności CNK-89 w wyniku preinkubacji kombinacją IL-12 + IL-18 względem komórek białaczkowych doprowadził do wysnucia kolejnego pytania badawczego dotyczącego stabilności tego efektu w czasie, co skutkowało wykonaniem eksperymentów porównujących poziom cytotoksyczności komórek bezpośrednio po pozbawieniu ich dostępu do interleukin z poziomem cytotoksyczności komórek po 2 oraz 7 dniach po usunięciu cytokin z układu. Wyniki wskazały jednoznacznie na tendencję utrzymywania się podwyższonego efektu cytotoksycznego. Zjawisko to można próbować wyjaśnić odwołując się ponownie do kwestii dojrzewania komórek typu NK. Być może komórki CNK-89 w stanie niepobudzonym znajdują się na wcześniejszym etapie różnicowania, niż komórki CNK-89 poddane stymulacji kombinacją IL-12 + IL-18. Żeby rozwiązać to zagadnienie konieczne jest dokładne zbadanie procesu dojrzewania psich komórek NK i ustanowienie markerów fenotypowych klasyfikujących tego typu komórki. Ponadto dobrym pomysłem byłoby wyprowadzenie podlinii komórek CNK-89, która byłaby systematycznie traktowana kombinacją IL-12 + IL-18 i monitorowanie jej aktywności cytotoksycznej oraz właściwości fenotypowych w kolejnych punktach czasowych hodowli. Oprócz właściwości naukowych linia taka mogłaby przyczynić się do zaprojektowania skutecznej terapii dla nowotworów psich na bazie komórek aktywowanych *ex vivo*, co ominęłoby także konieczność aplikowania związków stymulujących do organizmu pacjenta, co było niewątpliwie dużym minusem w przypadku terapii na bazie komórek NK wykorzystującej podawanie pacjentom dodatkowo IL-2, która okazała się dla chorych toksyczna⁹⁴.

Badania zawarte w niniejszej pracy potwierdzają, że po raz pierwszy możliwe było ustanowienie linii komórkowej pochodzenia psiego o właściwościach i fenotypie limfocytów typu NK. Linie komórkowe są wygodnym narzędziem do przeprowadzania szybkich testów na poziomie badań podstawowych, zwłaszcza jeżeli chodzi o wykonanie badań przesiewowych przy użyciu panelu potencjalnych terapeutyków w leczeniu nowotworów. Linia CNK-89, mając właściwości komórek NK wydaje się tutaj szczególnie potrzebna, biorąc pod uwagę optymistyczne doniesienia literaturowe opisujące sukcesy w terapiach przeciwnowotworowych przeprowadzanych u człowieka przy użyciu tego typu komórek. Oprócz roli w tworzeniu potencjalnej terapii przeciwnowotworowej u psów, linia CNK-89 może być także narzędziem do studiowania biologii i funkcji psich komórek typu NK, które do tej pory nie są jeszcze wystarczająco scharakteryzowane. Ponadto warto mieć

na uwadze fakt, iż linia CNK-89 jest linią komórkową wywodzącą się z nowotworu, dzięki czemu może służyć jednocześnie jako cel terapeutyczny, reprezentujący grupę białaczek/chłoniaków o podłożu komórek NK.

W tematyce badań nad aktywacją komórek NK znaczna większość badań skupia się na efektach działania głównie interleukin 2 oraz 15. Zostało wielokrotnie dowiedzione, że IL-2 stosowana układowo jako chemioterapeutyk doprowadza do niszczenia także zdrowych komórek organizmu. Duże nadzieje budzi też IL-15, mniej jednak mówi się o działaniu IL-12 oraz IL-18, zwłaszcza u psów. Badania zawarte w niniejszej rozprawie uzupełniają tę lukę, a także stwarzają podwaliny do badań nad nowymi terapiami wykorzystujących te cytokiny.

Pomimo wykazywania przez komórki CNK-89 cytotoksyczności względem komórek nowotworowych, właściwość ta nie osiągała wysokich poziomów i pełnej skuteczności zabijania komórek docelowych. Umiarkowana cytotoksyczność oraz brak obecności markera CD16 przy jednoczesnym dużym poziomie markera CD56 wskazywać mogą, iż komórkom CNK-89 bliżej jest do frakcji klasyfikowanej jako komórki NK immunoregulatorowe, niż cytotoksyczne. Nie jest to jednak cecha wykluczająca znaczenie komórek CNK-89 w terapiach przeciwnowotworowych, bowiem użyteczność właściwości immunoregulatorowych w mikrośrodkowisku nowotworu może przewyższać skuteczność bezpośredniej cytotoksyczności. Badania na ten temat zaprezentowali Yang i współpracownicy w pracy dotyczącej nowej linii ludzkiej komórek typu NK, NK101. W pracy tej porównano cytotoksyczność względem komórek 4T1 *in vitro* oraz *in vivo* (model myszy z wszczepionymi komórkami 4T1) linii NK-92 oraz NK101⁷⁹. W teście *in vitro* wyższą cytotoksyczność wykazała linia NK-92, natomiast w modelu *in vivo* nowotwór zabijany był skuteczniej w przypadku zastosowania komórek NK101. Profil wydzielanych cytokin przez komórki NK immunoregulatorowe może wywoływać migrację innych komórek cytotoksycznych (np. makrofagów), których właściwości będą wspierać umiarkowaną cytotoksyczność immunoregulatorowych komórek NK, przez co nowotwór będzie atakowany na różne sposoby, co zwiększa szanse na jego skuteczną likwidację. Podobne eksperymenty porównawcze na modelu *in vitro* oraz *in vivo* można w przyszłości przeprowadzić przy użyciu linii CNK-89, co pozwoliłoby na oszacowanie potencjału terapeutycznego tych komórek w modelu zwierzęcym. Wskazane byłyby także rozszerzone badania panelu wydzielanych cytokin przez komórki CNK-89 i porównanie ich z profilem komórek NK-92. Wreszcie, ciekawym pomysłem na wykorzystanie wiedzy dotyczącej funkcjonalności komórek NK immunoregulatorowych oraz cytotoksycznych *in vivo*

byłoby badanie polegające na wszczępieniu organizmowi modelowemu heterogennej populacji komórek NK, zawierającej zarówno linię o właściwościach immunoregulatorowych oraz jej wariant wykazujący większą cytotoksyczność, w odpowiednim stosunku komórek immunoregulatorowych do cytotoksycznych. Badania wstępne do takiego projektu pozwoliłyby na ocenienie, która ze wspomnianych populacji powinna występować w większej zasobności w stosunku do drugiej. Zgodnie ze stanem mojej aktualnej wiedzy, takie badania nie były jeszcze publikowane. Właściwie zoptymalizowana terapia tego typu pozwoliłaby na wykorzystanie bezpośrednich właściwości cytotoksycznych wobec komórek nowotworowych przy jednoczesnej kompleksowej stymulacji pozostałych komórek układu odpornościowego.

Podsumowując, komórki CNK-89 wykazują charakterystykę fenotypową i funkcjonalną psich komórek typu NK ze wskazaniem na fenotyp komórek NK typu regulatorowych. Komórki CNK-89 wykazują cytotoksyczność względem psich komórek białaczkowych. Wyniki składające się na niniejszą pracę wskazują, iż komórki CNK-89 mogą służyć jako wygodny model badawczy do badania biologii psich komórek typu NK, ich pochodzenie nowotworowe czyni je jednocześnie kolejną linią reprezentującą model psiego nowotworu, a zarazem komórki te ze względu na swoje właściwości cytotoksyczne mogą być w przyszłości użyte w dalszych pracach w kierunku stworzenia terapii przeciwnowotworowej dla psów wykorzystujących komórki typu NK jako komórki efektorowe.

6. Wnioski

- 1) Komórki CNK-89 wykazują cechy fenotypowe psich komórek typu NK. Pomiar cytometryczny wykazał obecność markerów powierzchniowych: CD5, CD8, CD45, CD56, CD79a oraz NKp46. Badanie wykonane za pomocą reakcji RT-PCR wykazało obecność transkryptów CD56, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 oraz perforyny.
- 2) Linie komórkowe psich białaczek/chłoniaków typu B: CLB70, CLBL-1, GL-1 wykazały wrażliwość na zabijanie przez komórki ludzkie NK-92 oraz psie komórki cPBMC, co udowadnia, że linie te mogą być stosowane w testach cytotoksyczności wykorzystującej aktywność komórek typu NK.
- 3) Komórki CLB70 oraz CLBL-1 ulegały cytotoksyczności komórek CNK-89 po 4 godz., natomiast komórki GL-1 po 24 godz. Efekt cytotoksyczny komórek CNK-89 był także widoczny względem psich prawidłowych komórek śródbłónka CBIMEC po 24 godz.
- 4) Stymulacja kombinacją IL-12+IL-18 przez 48 godz. poprawiła właściwości cytotoksyczne komórek CNK-89 względem komórek CLB70 oraz GL-1. Efekt cytotoksyczny utrzymywał się po 2 oraz 7 dniach od pozbawienia komórek CNK-89 interleukin.

7. Piśmiennictwo

1. Judge, S. J. et al. Blood and tissue biomarker analysis in dogs with osteosarcoma treated with palliative radiation and intra-tumoral autologous natural killer cell transfer. *PLoS One* **15**, e0224775 (2020).
2. Olson, B., Li, Y., Lin, Y., Liu, E. T. & Patnaik, A. Mouse models for cancer immunotherapy research. *Cancer Discov.* **8**, 1358–1365 (2018).
3. Pawlak, A., Obmińska-Mrukowicz, B. & Rapak, A. The dog as a model for comparative studies of lymphoma and leukemia in humans * Pies jako model do badań porównawczych nad ludzkimi chłoniakami i białaczkami. *Postep. Hig Med Dosw* **67**, 471–480 (2013).
4. Nakaichi, M. et al. Establishment and characterization of a new canine B-cell leukemia cell line. *J. Vet. Med. Sci.* **58**, 469–471 (1996).
5. Rütgen, B. C. et al. Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. *Leuk. Res.* **34**, 932–938 (2010).
6. Momoi, Y. et al. Establishment and characterization of a canine T-lymphoblastoid cell line derived from malignant lymphoma. *Vet. Immunol. Immunopathology* **59**, 11–20 (1997).
7. Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P. & Kuby, J. *Kuby Immunology*. (New York : W.H. Freeman, c2013., 2013).
8. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **22**, 633–640 (2001).
9. Yu, J., Freud, A. G. & Caligiuri, M. A. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* **34**, 573–582 (2013).

10. Klaassen, J. K. Reference values in veterinary medicine. *Lab. Med.* **30**, 194–197 (1999).
11. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461–469 (2008).
12. Freud, A. G. et al. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* **22**, 295–304 (2005).
13. Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M. & Vivier, E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **1** (2018). doi:10.1038/s41577-018-0061-z
14. Shin, D.-J. et al. Ex vivo expansion of canine cytotoxic large granular lymphocytes exhibiting characteristics of natural killer cells. *Vet. Immunol. Immunopathology* **153**, 249–59 (2013).
15. Bonkobara, M. et al. Characterization of cDNA and the genomic sequence encoding canine neural-cell adhesion molecule, CD56/N-CAM. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **107**, 171–176 (2005).
16. Bonkobara, M. et al. Blastic natural killer cell leukaemia in a dog – A case report. *Vet. J.* **174**, 659–662 (2007).
17. Huang, Y.-C. et al. CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1501–1510 (2008).
18. Grøndahl-Rosado, C., Bønsdorff, T. B., Brun-Hansen, H. C. & Storset, A. K. NCR1+ cells in dogs show phenotypic characteristics of natural killer cells. *Veterinary Research Communications* **39**, 19–30 (2015).
19. Grøndahl-Rosado, C., Boysen, P., Johansen, G. M., Brun-Hansen, H. & Storset, A. K. NCR1 is an activating receptor expressed on a subset of canine NK cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **177**, 7–15 (2016).

20. Lin, Y.-C. C. et al. Canine CD8 T cells showing NK cytotoxic activity express mRNAs for NK cell-associated surface molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **133**, 144–153 (2010).
21. Foltz, J. A. et al. NCR1 expression identifies canine natural killer cell subsets with phenotypic similarity to human natural killer cells. *Front. Immunol.* **7**, 1–15 (2016).
22. Kim, Y. et al. Canine non-B, non-T NK lymphocytes have a potential antibody-dependent cellular cytotoxicity function against antibody-coated tumor cells. *BMC Vet. Res.* **15**, 339 (2019).
23. Lee, S.-H. et al. Comparison of Phenotypic and Functional Characteristics Between Canine Non-B, Non-T Natural Killer Lymphocytes and CD3+CD5dimCD21–Cytotoxic Large Granular Lymphocytes. *Front. Immunol.* **9**, 841 (2018).
24. Canter, R. J. et al. Radiotherapy enhances natural killer cell cytotoxicity and localization in pre-clinical canine sarcomas and first-in-dog clinical trial. *J. Immunother. Cancer* **5**, (2017).
25. Graves, S. S. et al. Development and characterization of a canine-specific anti-CD94 (KLRD-1) monoclonal antibody. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **211**, 10–18 (2019).
26. MCDonough, S. P., Moore, P. F. & Moore, R. F. Clinical, hematologic, and immunophenotypic characterization of canine large granular lymphocytosis. *Vet. Pathol.* **37**, 637–646 (2000).
27. Knapp, D. W. et al. Ultrastructure and cytochemical staining characteristics of canine natural killer cells. *Anat. Rec.* **243**, 509–515 (1995).
28. Lee, S. H., Shin, D. J. & Kim, S. K. Generation of recombinant canine interleukin-15 and evaluation of its effects on the proliferation and function of canine NK cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **165**, 1–13 (2015).
29. Huang, Y.-C. et al. CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood

- show characteristics of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1501–1510 (2008).
30. Park, J.-Y. et al. The anti-canine distemper virus activities of ex vivo-expanded canine natural killer cells. *Vet. Microbiol.* **176**, 239–249 (2015).
 31. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
 32. Smyth, M. J. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **42**, 501–510 (2005).
 33. Grudzien, M. & Rapak, A. Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation. *J. Immunol. Res.* **2018**, 1–11 (2018).
 34. Lu, C. C. & Chen, J. K. Resveratrol enhances perforin expression and NK cell cytotoxicity through NKG2D-dependent pathways. *J. Cell. Physiol.* **223**, 343–351 (2010).
 35. Lai, H.-C. et al. Activation of NK cell cytotoxicity by the natural compound 2,3-butanediol. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 807–814 (2012).
 36. Romera-Cárdenas, G. et al. Ionomycin treatment renders NK cells hyporesponsive. *PLoS One* **11**, e0150998 (2016).
 37. Kasza, L. Establishment and characterization of canine thyroid adenocarcinoma and canine melanoma cell lines. *Am. J. Vet. Res.* **25**, 1178–85 (1964).
 38. Nakada, Y. et al. Correlation between canine NK cell mediated cytotoxicity and radical production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45**, 285–295 (1995).
 39. Nakada, Y. et al. Characterization of natural killer cytotoxic factor (NKCF) from canine NK cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **49**, 283–293 (1996).
 40. Addissie, S. & Klingemann, H. Cellular immunotherapy of canine cancer. *Vet. Sci.*

- 5, (2018).
41. Nakada, Y. et al. Release Of Natural Killer Cytotoxic Factor (NKCF) from Canine Natural Killer (NK) Cells Stimulated with Cytoplasmic Membrane of Target Cells. *J. Vet. Med. Sci.* **57**, 167–167 (1995).
 42. Nariai, N. Y., Nariai, K., Kosaka, T., Kuwabara, M. & Kiuchi, Y. Morphological observation of canine natural killer cells mediated cytotoxicity. *J. Vet. Med. Sci.* **61**, 835–838 (1999).
 43. Nariai, Y. et al. Active-Oxygen Involvement in Canine NK-Mediated Cytotoxicity. *J. Vet. Med. Sci.* **62**, 457–460 (2000).
 44. Knapp, D. W. et al. Measurement of NK activity in effector cells purified from canine peripheral lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathology* **35**, 239–251 (1993).
 45. Helfand, S. C., Soergel, S. A., Modiano, J. F., Hank, J. A. & Sondel, P. M. Induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in canine lymphocytes with low dose human recombinant interleukin-2 in vitro. *Cancer Biother.* **9**, 237–44 (1994).
 46. Shin, D.-J. J. et al. Interleukin-21 induces proliferation and modulates receptor expression and effector function in canine natural killer cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **165**, 22–33 (2015).
 47. Michael, H. T. et al. Isolation and characterization of canine natural killer cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **155**, 211–217 (2013).
 48. Loughran, T. P., Deeg, H. J. & Storb, R. Morphologic and phenotypic analysis of canine natural killer cells: Evidence for T-cell lineage. *Cell. Immunol.* **95**, 207–217 (1985).
 49. Krakowka, S. Natural killer cell activity in adult gnotobiotic dogs. *Am. J. Vet. Res.* **44**, 635–8 (1983).

50. Raskin, R. E. et al. Natural killer cell activity in untreated and treated dogs with lymphoma. *Am. J. Vet. Res.* **50**, 483–487 (1989).
51. Gondolf, C., Burkhardt, E., Failing, K. & Stitz, L. A new colorimetric method for measuring cell-mediated cytotoxicity in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* **55**, 11–22 (1996).
52. Funk, J., Schmitz, G., Bach, U., Failing, K. & Burkhardt, E. Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in isolated blood lymphocytes from 100 dogs with tumours. *Res. Vet. Sci.* **75**, 87 (2003).
53. Funk, J., Schmitz, G., Failing, K. & Burkhardt, E. Natural killer (NK) and lymphokine-activated killer (LAK) cell functions from healthy dogs and 29 dogs with a variety of spontaneous neoplasms. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**, 87–92 (2005).
54. Matsumoto, H., Miyata, T., Ohkusa, T., Teshima, T. & Koyama, H. Effects of recombinant canine interferon- γ injected before general anesthesia with propofol and isoflurane on natural killer cytotoxic activity during anesthesia in dogs. *Res. Vet. Sci.* **125**, 416–420 (2019).
55. Guenther, W. et al. NK activity of canine blood and marrow cells. *Tissue Antigens* **1994**, 2–5 (1994).
56. Ringler, S. S. & Krakowka, S. Effects of canine distemper virus on natural killer cell activity in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 1781–6 (1985).
57. Gondolf, C., Kipar, A. & Burkhardt, E. Two mesenchymal tumor cell lines for the determination of natural killer (NK) cell activity in the peripheral blood of dogs. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **108**, 47–50 (1995).
58. Lin, C. S. et al. Activating natural killer (NK) cytotoxicity of canine CD5-CD21-cells requires low surface CD5 density NK cells. *Iran. J. Vet. Res.* **19**, 87–95 (2018).

59. Lee, S.-H. et al. Comparison of Phenotypic and Functional Characteristics Between Canine Non-B, Non-T Natural Killer Lymphocytes and CD3+CD5dimCD21-Cytotoxic Large Granular Lymphocytes. *Front. Immunol.* **9**, 841 (2018).
60. Miyata, T. et al. Effect of rCaIFN- γ on NK cytotoxic activity in the peripheral blood of dogs. *Res. Vet. Sci.* **95**, 965–968 (2013).
61. Miyata, T. et al. Effect of rCaIFN- γ pretreatment on propofol–isoflurane suppression of NK cytotoxic activity in the peripheral blood of dogs. *Res. Vet. Sci.* **98**, 25–29 (2015).
62. Damle, N. K., Doyle, L. V, Bender, J. R. & Bradley, E. C. Interleukin 2-activated human lymphocytes exhibit enhanced adhesion to normal vascular endothelial cells and cause their lysis. *J. Immunol.* **138**, 1779–85 (1987).
63. Aronson, F. R., Libby, P., Brandon, E. P., Janicka, M. W. & Mier, J. W. IL-2 rapidly induces natural killer cell adhesion to human endothelial cells. A potential mechanism for endothelial injury. *J. Immunol.* **141**, 158–63 (1988).
64. Klingemann, H., Boissel, L. & Toneguzzo, F. Natural killer cells for immunotherapy - Advantages of the NK-92 cell line over blood NK cells. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
65. Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321–334 (1975).
66. Konjević, G. M., Vuletić, A. M., Mirjačić Martinović, K. M., Larsen, A. K. & Jurišić, V. B. The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment. *Cytokine* **117**, 30–40 (2019).
67. Quintin-Colonna, F. et al. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther.* **3**, 1104–12 (1996).
68. Lamprecht, U. et al. Gene Electrotransfer of Canine Interleukin 12 into Canine

- Melanoma Cell Lines. *J. Membr. Biol.* **248**, 909–917 (2015).
69. Chou, P. C. et al. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **130**, 25–34 (2009).
 70. Li, Y. & Sun, R. Tumor immunotherapy: New aspects of natural killer cells. *Chinese J. Cancer Res.* **30**, 173–196 (2018).
 71. Paoloni, M. et al. Defining the Pharmacodynamic Profile and Therapeutic Index of NHS-IL12 Immunocytokine in Dogs with Malignant Melanoma. *PLoS One* **10**, e0129954 (2015).
 72. Gong, J. H., Maki, G. & Klingemann, H. G. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* **8**, 652–8 (1994).
 73. Klingemann, H. Immunotherapy for dogs: Running behind humans. *Front. Immunol.* **9**, 5–10 (2018).
 74. Pawlak, A. et al. A novel canine B-cell leukaemia cell line. Establishment, characterisation and sensitivity to chemotherapeutics. *Vet. Comp. Oncol.* **15**, 1218–1231 (2016).
 75. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
 76. Chang, L. et al. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* **166**, 45–54 (1993).
 77. Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R. & Tian, Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **10**, 230–252 (2013).

78. Drexler, H. G. & Matsuo, Y. Malignant hematopoietic cell lines : in vitro models for the study of natural killer cell leukemia – lymphoma. *Leukemia* **14**, 777–782 (2000).
79. Yang, H. G. et al. Discovery of a novel natural killer cell line with distinct immunostimulatory and proliferative potential as an alternative platform for cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **7**, 138 (2019).
80. Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S. & Sondel, P. M. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **6**, 368 (2015).
81. American Society of Hematology. Available at: <http://imagebank.hematology.org/image/60516/large-granular-lymphocyte?type=upload>. (Accessed: 13th July 2020)
82. Blakolmer, K. et al. Immunoreactivity of B-cell markers (CD79a, L26) in rare cases of extranodal cytotoxic peripheral T- (NK/T-) cell lymphomas. *Mod. Pathol.* **13**, 766–772 (2000).
83. Reynaud, D., Lefort, N., Manie, E., Coulombel, L. & Levy, Y. In vitro identification of human pro-B cells that give rise to macrophages, natural killer cells, and T cells. *Blood* **101**, 4313–4321 (2003).
84. Törnroos, H., Hägerstrand, H. & Lindqvist, C. Culturing the human natural killer cell line NK-92 in interleukin-2 and interleukin-15 - Implications for clinical trials. *Anticancer Res.* **39**, 107–112 (2019).
85. Tsartsalis, D. et al. In vitro exposure of NK-92 cells to serum from patients with non-small cell lung cancer impairs their cytotoxicity. *Anticancer Res.* **35**, 1543–1548 (2015).
86. Pawlak, A., Rapak, A., Zbyryt, I. & Obmińska-Mrukowicz, B. The effect of common antineoplastic agents on induction of apoptosis in canine lymphoma and leukemia cell lines. *In Vivo (Brooklyn)*. **28**, 843–850 (2014).

87. Yodoi, J. et al. TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL 2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J. Immunol.* **134**, 1623–30 (1985).
88. Wu, Y., Tian, Z. & Wei, H. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
89. Vacca, P., Martini, S., Mingari, M. C. & Moretta, L. NK cells from malignant pleural effusions are potent antitumor effectors: A clue for adoptive immunotherapy? *Oncoimmunology* **2**, e23638 (2013).
90. Tonn, T. et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* **15**, 1563–1570 (2013).
91. Song, Y. et al. IL-12/IL-18-preactivated donor NK cells enhance GVL effects and mitigate GvHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur. J. Immunol.* **48**, 670–682 (2018).
92. Poznanski, S. M. et al. Combined Stimulation with Interleukin-18 and Interleukin-12 Potently Induces Interleukin-8 Production by Natural Killer Cells. *J. Innate Immun.* **9**, 511–525 (2017).
93. Lauwerys, B. R., Renauld, J. C. & Houssiau, F. A. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine* **11**, 822–830 (1999).
94. Rosenberg, S. A. et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* **316**, 889–97 (1987).

8. Wykaz rycin i tabel

<i>Ryc. 1 Procentowy skład elementów krwi ludzkiej oraz psiej, z uwzględnieniem zawartości procentowej populacji komórek NK.</i>	13
<i>Ryc. 2 Panel receptorów zidentyfikowanych na powierzchni komórek NK.</i>	15
<i>Ryc. 3 Mechanizmy aktywacji komórki NK oraz rodzaje odpowiedzi cytotoksycznej względem komórek docelowych.</i>	18
<i>Ryc. 4 Wpływ poszczególnych interleukin na właściwości komórek NK.</i>	22
<i>Ryc. 5 Reprezentatywne histogramy obrazujące fenotyp materiału pierwotnego.</i>	43
<i>Ryc. 6 Reprezentatywne histogramy obrazujące fenotyp linii komórkowej CNK-89.</i>	45
<i>Ryc. 7 Identyfikacja transkryptów markerów komórek typu NK w komórkach linii CNK-89.</i>	47
<i>Ryc. 8 Zdjęcia komórek CNK-89.</i>	48
<i>Ryc. 9 Strategia bramkowania komórek użyta w eksperymentach pomiaru bezpośredniej cytotoksyczności populacji komórek cytotoksycznych względem komórek docelowych.</i>	50
<i>Ryc. 10 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych ludzkiej linii typu NK względem komórek docelowych ludzkiej linii nowotworowej.</i>	51
<i>Ryc. 11 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych ludzkiej linii typu NK względem komórek docelowych psich linii nowotworowych.</i>	52
<i>Ryc. 12 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych zawartych we frakcji psich komórek PBMC względem komórek docelowych psich linii nowotworowych.</i>	54
<i>Ryc. 13 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK względem komórek docelowych psich linii nowotworowych.</i>	56
<i>Ryc. 14 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK względem komórek docelowych psich linii nowotworowych.</i>	58
<i>Ryc. 15 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK względem komórek docelowych psiej linii śródblonka.</i>	59
<i>Ryc. 16 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK względem komórek docelowych psiej linii śródblonka.</i>	60
<i>Ryc. 17 Zawartość wydzielanego IFNγ w próbkach medium z nad komórek CNK-89 nietraktowanych oraz traktowanych wybranymi interleukinami lub ich kombinacjami przez 48 godz.</i>	61
<i>Ryc. 18 Zawartość wydzielanego TNFα w próbkach medium z nad komórek CNK-89 nietraktowanych oraz traktowanych wybranymi interleukinami lub ich kombinacjami przez 48 godz.</i>	62
<i>Ryc. 19 Zawartość mRNA w komórkach CNK-89 po traktowaniu wybranymi interleukinami oraz ich kombinacjami przez 48 godz. oceniona za pomocą reakcji RT-PCR i uwidoczniiona poprzez elektroforezę na żelu agarozowym.</i>	63
<i>Ryc. 20 Schemat eksperymentu oceniającego cytotoksyczność medium z nad komórek CNK-89 traktowanych wybranymi interleukinami.</i>	64
<i>Ryc. 21 Aktywność cytotoksyczna medium z nad komórek NK wobec komórek docelowych CLBL-1 oraz CLB70.</i>	65

Ryc. 22 Schemat eksperymentu cytotoksyczności bezpośredniej komórek efektorowych CNK-89 względem komórek docelowych.	66
Ryc. 23 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK preinkubowanych z interleukinami oraz nietraktowanych względem komórek docelowych psiej linii nowotworowej.	67
Ryc. 24 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK preinkubowanych z interleukinami oraz nietraktowanych względem komórek docelowych psiej linii nowotworowej.	68
Ryc. 25 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK preinkubowanych z interleukinami oraz nietraktowanych względem komórek docelowych psiej linii nowotworowej.	69
Ryc. 26 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK preinkubowanych z interleukinami oraz nietraktowanych względem komórek docelowych psiej linii śródbrzońki.	70
Ryc. 27 Schemat eksperymentu obejmującego wpływ wybranych interleukin na cytotoksyczność komórek CNK-89 bezpośrednio po zakończeniu traktowania oraz 2 dni po zakończeniu traktowania.	71
Ryc. 28 Schemat eksperymentu obejmującego wpływ wybranych interleukin na cytotoksyczność komórek CNK-89 bezpośrednio po zakończeniu traktowania oraz 7 dni po zakończeniu traktowania.	72
Ryc. 29 Cytotoksyczność bezpośrednia komórek efektorowych psiej linii typu NK preinkubowanych z interleukinami po 2 dniach od usunięcia interleukin z układu porównanych z cytotoksycznością komórek NK preinkubowanych z interleukinami i pozbawionych interleukin w dzień przeprowadzenia eksperymentu oraz preinkubowanych z interleukinami po 7 dniach od usunięcia interleukin z układu porównanych z cytotoksycznością komórek NK preinkubowanych z interleukinami i pozbawionych interleukin w dzień przeprowadzenia eksperymentu względem komórek docelowych psiej linii nowotworowej.	73
Ryc. 30 Cząsteczki zidentyfikowane na powierzchni komórek CNK-89 (lub w przypadku CD79a wewnątrzkomórkowo) przy pomocy cytometrii przepływowej oraz transkrypty w komórkach CNK-89 zidentyfikowane przy pomocy metody RT-PCR.	77
Tab. 1 Zestawienie psich linii komórkowych używanych w testach cytotoksyczności wykorzystujących psie komórki typu NK	19
Tab. 2 Linie komórkowe użyte w niniejszej pracy	28
Tab. 3 Lista przeciwciał użytych do fenotypowania komórek CNK-89	31
Tab. 4 Przebieg reakcji trawienia DNazą	34
Tab. 5 Przebieg reakcji odwrotnej transkrypcji	34
Tab. 6 Sekwencje starterów użytych do amplifikacji genów zawartych w psim cDNA.	36
Tab. 7 Składniki reakcji PCR	37
Tab. 8 Przebieg reakcji PCR	37
Tab. 9 Rodzaje linii komórkowych oraz mediów wykorzystywanych w eksperymentach bezpośredniej cytotoksyczności	39