



Dr hab. Marcin Okrój, prof. GUMed
Zakład Biologii Komórki i Immunologii UG-GUMed
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel. (58) 3491410
e-mail: marcin.okroj@gumed.edu.pl

Gdańsk, 21 czerwca 2022 r

Zakład Biologii Komórki
i Immunologii
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Domagały pt.
„Ocena wpływu wybranych metabolitów na aktywność komórek NK”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr inż. Joanny Domagały zatytułowana „Ocena wpływu wybranych metabolitów na aktywność komórek NK” ma formę monografii. Autorka w obszerny sposób przedstawia stan obecnej wiedzy na temat roli produktów przemiany materii powstałych w mikrośrodku komórek nowotworowych a także badania własne dotyczące oddziaływania metabolitów szlaku rozkładu glutaminy na wybrane funkcje efektorowe limfocytów posiadających właściwości naturalnej cytotoksyczności, tzw. (*ang.*) natural killer (NK) cells. O ile fakt zwiększonego tempa metabolizmu glukozy w komórkach transformowanych nowotworowo i jej wykorzystanie w procesie beztlenowej glikolizy jest powszechnie znany od ponad 100 lat, o tyle dane na temat metabolizmu glutaminy są znacznie bardziej ubogie. Jednym z produktów ubocznych rozpadu glutaminy są amonowe związki azotu, występujące w zależności od pH w formie amoniaku lub jonu amonowego. Doktorantka w pierwszej kolejności przeprowadziła szczegółowe analizy dotyczące wpływu niskocząsteczkowych metabolitów obecnych w medium kondycjonowanym przez komórki nowotworowe w hodowli *in vitro* na funkcję komórek NK. Jako że jednym z metabolitów obecnych w badanej frakcji były amonowe związki azotu, kolejne doświadczenia skupiały się na określeniu modulacji cytotoksyczności komórek NK przez amoniak/jon amonowy (wprowadzony do środowiska w postaci chlorku amonu NH_4Cl). Trzecim celem pracy było poznanie molekularnego mechanizmu wpływu $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ na funkcje efektorowe komórek NK. Podjęta tematyka jest ważna nie tylko w aspekcie czysto naukowym ale także praktycznym. Komórki NK stają się coraz bardziej popularnym i atrakcyjnym efektem różnych terapii przeciwnowotworowych opartych zarówno o przeciwciała monoklonalne zdolne do wydajnej aktywacji mechanizmu ADCC (cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał) jak i terapii wykorzystujących transfer adopcyjny komórek odpornościowych pacjenta modyfikowanych w warunkach *ex vivo*. Zrozumienie, w jaki sposób mikrośrodku komórek nowotworowych interferuje z mechanizmami efektorowymi komórek NK może przyczynić się do istotnych z klinicznego punktu widzenia modyfikacji takich terapii oraz stworzenia nowych leków czy strategii leczenia pacjentów.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska zawiera się w postaci wydruku komputerowego w formacie A4, na który składa się 40 stron wstępu, jedna strona opisująca założenia i cele pracy, 21 stron opisu użytych materiałów i metod, 39 stron opisu uzyskanych wyników, 8 stron dyskusji, jedną stronę wniosków podsumowujących oraz spis piśmiennictwa obejmujący 262 pozycje literaturowe. Ponadto w pracy znajdujemy spis rycin i tabel, wykaz używanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Układ pracy jest typowy dla podobnych monografii, wprowadzony podział na poszczególne części i podrozdziały jest logiczny, zwłaszcza we wstępie, gdzie doktorantka stopniowo wprowadza czytelnika w treści o coraz większym stopniu szczegółowości. Bardzo pomocne dla zrozumienia części eksperymentalnej pracy są ilustracje zawarte w opisie metod, które przedstawiają strategię bramkowania w doświadczeniach przeprowadzonych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. W pracy znalazłem kilka błędów edytorskich (tzw. literówek) i stylistycznych, co jednak, zważywszy na stosunkowo dużą objętość pracy, nie jest zjawiskiem nagminnym a raczej marginalnym. Ponadto na stronie 50 pojawił się błąd o charakterze przejęzyczenia, które z recenzenckiego obowiązku zmuszony jestem wymienić:

„(...) w procesie glikolizy beztlenowej z jednej cząsteczki glukozy powstają jedynie 2 mole ATP oraz kwas mlekowy” – zapewne doktorantce chodziło o jeden mol glukozy.

Tym niemniej, przytoczone błędy nie wpływają na całościowy obraz pracy, którą moim zdaniem czyta się płynnie i przyjemnie. Niewątpliwie pomaga w tym zastosowana w pracy zasada rozwinięcia pełnej nazwy skrótu przy jego pierwszym użyciu w tekście, niezależnie od dołączenia na początku pracy wykazu wszystkich stosowanych skrótów.

Ocena merytoryczna pracy

Na wstępie należy zaznaczyć, iż autorka wymienia publikację wydaną w czasopiśmie *Cancers* w roku 2020 zatytułowaną „The tumor microenvironment- a metabolic obstacle to NK cells' activity” jako pozycję literaturową powiązaną z niniejszą rozprawą doktorską. Doktorantka pełni w tej pracy rolę pierwszego autora, co sugeruje jej wiodącą rolę w powstaniu publikacji. Publikacja stanowi przegląd literaturowy dostępnej wiedzy na temat mechanizmów działania komórek NK, ich metabolizmu i interakcji z podścieliskiem komórek nowotworowych (w szczególności obecnych z nim produktów przemiany materii), które mogą wpływać na funkcjonalność komórek NK. Fakt wydania pracy w czasopiśmie plasującym się w pierwszym kwartylu rankingu JCR oraz liczba cytowań na chwilę obecną wynosząca 9 wskazują na doniosłość podjętej tematyki. Tezy zawarte w wydanej publikacji znajdują swoje rozwinięcie w poszczególnych rozdziałach wstępu niniejszej pracy doktorskiej.

Na chwilę obecną doktoranta nie wydała osobnej publikacji przedstawiającej oryginalne wyniki jej badań zawartych w pracy doktorskiej. Według mnie stanowią one jednak spójny i koherentny zbiór danych podsumowanych adekwatną dyskusją, który spełnia warunki konieczne do zaakceptowania go jako publikacji naukowej, co jest zapewne kwestią czasu. Do aspektów stanowiących o wartości badań przeprowadzonych w ramach doktoratu zaliczyłbym:

- Przeprowadzenie badań wstępnych nad modulacją naturalnej cytotoksyczności z użyciem pożywki zebranej z kilku linii komórkowych o różnym pochodzeniu, zarówno w modelu hodowli 2D jak i 3D.
- Badanie całego spektrum aktywności komórek NK czyli naturalnej cytotoksyczności komórek NK, wydajności reakcji ADCC oraz wydzielania cytokin
- Oszacowanie realnego stężenia azotu amonowego w płynie śródmiąższowym guzów nowotworowych powstałych z sześciu różnych typów komórek nowotworowych a następnie i posługiwanie się tak określonym, realistycznym przedziałem stężeń $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ w doświadczeniach przeprowadzonych w dalszej części pracy
- Sprawdzenie wpływu różnego rodzaju pożywek hodowlanych oraz pH roztworu na rozrzut otrzymywanych wyników i wybór optymalnych warunków doświadczalnych w oparciu o uzyskane dane


Przeprowadzenie wszystkich powyższych testów sprawia, iż kluczowe wyniki otrzymane w dalszej części pracy znajdują realne odniesienie do warunków, w jakich komórki NK operują wobec komórek nowotworowych w układzie *in vivo*. Jako ciekawe i uprawnione uproszczenie zastosowane w pracy, które jest jednocześnie wygodne z metodologicznego punktu widzenia, uznaję potraktowanie ekspresji antygenu CD107a jako markera degranulacji komórek NK. Dzięki jego zastosowaniu stosunkowo łatwo można było oszacować odsetek komórek zdolnych do przeprowadzenia degranulacji w określonych warunkach środowiskowych. Jako ważne i ciekawe a co ważniejsze, solidnie umocowane w otrzymanych wynikach wnioski wysnute z przeprowadzonych badań wymieniałbym zidentyfikowanie zmiany pH lizosomów wydzielniczych spowodowanej zwiększonym stężeniem jonu amonowego jako czynnika, który upośledza proces prawidłowej obróbki i wydzielania perforyny. Ponadto na uwagę zasługuje teza, iż jon amonowy moduluje odpowiedź immunologiczną komórek NK w kierunku mechanizmów indukujących zaprogramowaną śmierć komórki docelowej.

Uwagi, pytania i komentarze:

- 1) Wstęp, strona 23: Czy reakcja ADCC z udziałem komórek NK różni się znacząco od przebiegu reakcji z udziałem makrofagów/monocytów, neutrofilii i eozynofili? Jeśli tak, to w jakim aspekcie?
- 2) Wstęp, strona 24: W rozdziale 1.1.2 doktorantka wspomina o stymulacji komórek NK przy pomocy cytokin podczas ich namnażania *ex vivo*. Z kolei następny rozdział 1.1.3 nosi nazwę "terapię adoptywną". Czy stymulacja *ex vivo* cytokinami nie jest w tym przypadku także częścią schematu terapii adoptywnej?
- 3) Materiały i metody, strona 70: Poproszę o dopowiedzenie, jaka molekula była odpowiedzialna za absorbancję w paśmie 340 nm przy pomiarze stężenia jonu amonowego.
- 4) Materiały i metody, strona 70 i 82: podanie obrotów wirówki wyrażonych w rpm nie jest do końca informatywne gdyż wartość przyspieszenia kątownego zależy w tym przypadku od promienia rotora wirówki. Bardziej miarodajne są parametry wirowania podane w jednostkach rcf, co ma miejsce w opisach innych procedur doświadczalnych.
- 5) Wyniki, strona 97: Czy w jakiś sposób dodatkowo weryfikowano odcięcie filtra w zestawie do mikrofiltracji na zakładanym poziomie 3 kDa, przez np. analizę filtratu w spektrometrze masowym lub przy pomocy barwienia w żelu poliakrylamidowym?
- 6) Wyniki, strona 119: Opis doświadczenia sugeruje, że w doświadczeniu porównano ilość perforyny w komórkach NK niestymulowanych obecnością komórek docelowych. Dlaczego CD107a pojawiało się na komórkach NK niestymulowanych obecnością komórek docelowych i jaki to był % w ogólnej populacji komórek NK?
- 7) Wyniki, strona 126 i ryc. 50: Przedstawione wyniki opisujące zdolność do powtórnej degranulacji komórek NK zostały uzyskane przy zastosowaniu metody barwienia tym samym przeciwciałem skoniugowanym z różnymi fluorochromami. Przy pierwszej inkubacji stosowano jeden z wariantów przeciwciała a po odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał i ponownej inkubacji z komórkami docelowymi stosowano wariant przeciwciała z drugim fluorochromem. Dokładny opis metodyki mówi: "(...) komórki docelowe oraz efektorowe były inkubowane przez 2 godziny w obecności NH₄Cl oraz przeciwciała anti-CD107a-PE. Następnie wyplukano pierwsze przeciwciała i dodano nowe przeciwciała anti-CD107a wyznakowane innym fluorochromem (BV421), komórki inkubowano przez kolejne 4 godziny w obecności NH₄Cl. Po tym czasie za pomocą cytometrii przepływowej oceniono ilość komórek NK CD107a podwójnie pozytywnych w stosunku do obydwu fluorochromów (PE oraz BV421), "
Czy w jakikolwiek sposób weryfikowano wysycenie przeciwciał anti-CD107a po pierwszej inkubacji? Przykładowo, czy wykonano miareczkowanie pierwszego z przeciwciał i do doświadczenia użyto takiego stężenia, przy którym nie obserwowano już wzrostu sygnału od PE?

Wskazane powyżej uwagi i komentarze nie powinny umniejszać charakteru osiągnięcia naukowego mgr inż. Joanny Domagały. Oceniam je jako istotny wkład w zrozumienie interakcji pomiędzy metabolitami komórek nowotworowych oraz komórek zrębu a komórkami układu immunologicznego.

Praca wpisuje się w ważny i podnoszony w wielu opracowaniach naukowych kontekst modulacji odpowiedzi immunologicznej przez mikrośrodowisko zmiany nowotworowej i stanowi oryginalny zbiór danych, które w moim pojęciu staną się niedługo przedmiotem osobnej publikacji w czasopiśmie naukowym. Autorka wykazała się opanowaniem wielu technik laboratoryjnych, umiejętnością nawiązywania efektywnej współpracy w rozwiązywaniu problemów naukowych, umiejętnością krytycznej analizy otrzymanych wyników i ich interpretacji. Stwierdzam, że **rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.)** i niniejszym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG-GUMed
ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI I
IMUNOLOGII

dr hab. Marcin Okrój