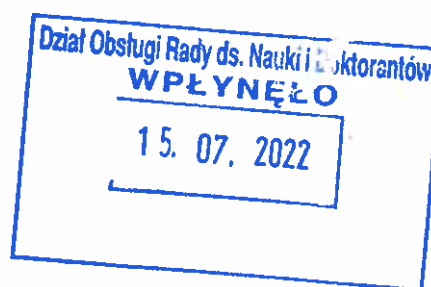


Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski  
Katedra i Zakład Immunologii Medycznej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk  
Tel. 058 3491590, 058 3491593  
Fax 058 3491591  
e-mail: [ptrzon@gumed.edu.pl](mailto:ptrzon@gumed.edu.pl)

Gdańsk 07.07.2022



### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Domagały: „Ocena wpływu wybranych metabolitów na aktywność komórek NK”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska to praca doświadczalna. Punktem wyjściowym pracy jest hipoteza, iż aktywność komórek NK ulega zmniejszeniu w mikrośrodowisku guza na skutek immunosupresyjnego wpływu metabolitów wydzielanych między innymi przez komórki nowotworowe, co w konsekwencji może prowadzić do braku skuteczności onkologicznych terapii adoptywnych. Jednym z charakterystycznych dla komórek nowotworowych metabolitów jest jon amonowy, którego akumulacja w obrębie guza następuje w wyniku nasilonego procesu glutaminolizy. W związku z tym celem pracy było zbadanie wpływu tego metabolitu na przeżycie oraz funkcje efektorowe komórek NK, tj. komórek odpowiedzialnych za nadzór immunologiczny i eliminację komórek nowotworowych. Realizacja tego celu odbyła się poprzez zbadanie wpływu  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  na przeżycie oraz funkcje efektorowe komórek NK oraz prześledzenie molekularnego mechanizmu wpływu tego metabolitu na funkcje efektorowe komórek NK. Wyniki pracy potwierdziły, iż jon amonowy ma negatywny wpływ na aktywność komórek NK, a mechanizm, który jest wykorzystywany w tym zjawisku to najprawdopodobniej zmiana pH lizosomów komórek NK, co w konsekwencji powoduje upośledzenie wydzielania perforyny.

Praca ma układ klasyczny. Rozpoczyna ją Wstęp, w którym Doktorantka w sposób szczegółowy omawia biologię komórek NK i ich wykorzystanie w immunoterapii nowotworów. Następnie przechodzi do charakterystyki metabolizmu komórek nowotworowych, w sposób szczególny skupiając się na glutaminolizie, akumulacji jonów

amonowych w mikrośrodowisku guza i znaczeniu tego zjawiska dla progresji guza. Rozdział jest napisany w sposób przystępny, Doktorantka używa współczesnej literatury dla poparcia swoich tez.

Kolejnym rozdziałem są Materiały i Metody, w którym Doktorantka przedstawiła szczegółowo stosowaną metodologię. Doświadczenia zostały wykonane z wykorzystaniem pierwotnych komórek NK izolowanych od zdrowych dawców oraz linii komórkowej NK-92. Za pomocą cytometrii przepływowej zbadano naturalną cytotoksyczność komórek NK wobec komórek linii K562, cytotoksyczność zależną od przeciwciał wobec komórek linii Raji, zdolność komórek NK do tworzenia koniugatów komórkowych oraz odłączania się od komórek docelowych, jak również oceniono poziom degranulacji komórek NK i ich zdolność do wytwarzania cytokin. W przypadku badania cytotoksyczności komórek CD19-CAR-NK-92 wykorzystano pomiar luminescencji w komórkach nowotworowych wykazujących ekspresję lucyferazy. Zmiany w ilości wybranych białek litycznych oceniono metodą Western blotting lub cytometrii przepływowej z wykorzystaniem wielokolorowych barwień. Ilość uwalnianej perforyny po kontakcie z komórką docelową oceniono z wykorzystaniem testu ELISA. Pomiaru stężenia  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  dokonano zarówno w modelu *in vitro* w zmetabolizowanej pożywce hodowlanej, jak i *in vivo* w płynie śródmiąższowym guza oraz płynie podskórnym. Mikroskopię konfokalną zastosowano do oceny pH lizosomów wydzielniczych komórek NK. Do oceny mechanizmu zabijania wykorzystywanego przez komórki NK wykorzystano komórki linii HeLa charakteryzujące się ekspresją cząsteczki CD48 oraz transfekowanych wektorem. Narzędzie to pozwala na ocenę aktywacji kaspazy 8 oraz granzymu B w komórkach docelowych w wyniku zabicia przez komórki NK. Mikroskopię wykorzystano również do oceny zdolności komórek NK do seryjnego zabijania komórek docelowych K562. Dobór metod uważam za właściwy do zaproponowanego celu pracy. Użyte techniki są nowoczesne i pozwoliły odpowiedzieć na zadawane w pracy pytania badawcze. Moją szczególną uwagę zwróciła duża biegłość Autorki w posługiwaniu się technikami barwienia i odczytu danych z testów z hodowli komórkowych przy użyciu cytometru przepływowego.

Kolejnymi rozdziałami są Dyskusja i Wnioski, w których Autorka w sposób przekonujący zinterpretowała uzyskane wyniki. Użyta literatura podobnie jak we Wstępie jest adekwatna i w pełni popiera wnioski wysnute przez Doktorantkę.

Nie znalazłem istotnych pomyłek lub błędów w pracy. Jeśli chodzi o pytania do pracy to dobre zaprojektowanie układu doświadczeń, uzyskane wyniki i ciąg logiczny wniosków tłumaczą zasadniczą część moich wątpliwości. Bardziej z ciekawości badacza niż jako uwagi krytyczne chciałbym jednak zapytać o następujące kwestie:

1. Dyskusja zawiera fragment odnoszący się do mojego pytania, ale nadal jest oto ważne zagadnienie. W badaniach użyto PBMC zdrowych dawców. Czy nie byłoby wskazane użyć materiału od pacjentów onkologicznych? Wyobrażam sobie, że w przypadku różnych nowotworów wyniki mogłyby się różnić w zależności od rodzaju guza i stopnia jego zaawansowania.
2. Czy upośledzenie odporności obserwowane w innych stanach chorobowych z wysokim stężeniem jonu amonowego (np. mocznica w ESRD) mogłoby być tłumaczone uzyskanymi przez Doktorantkę wynikami pracy?
3. W opisie statystyk użyto opisu „Dla każdego doświadczenia wykonano przynajmniej dwa powtórzenia techniczne z dwóch powtórzeń biologicznych”. Ile było tych powtórzeń, ile powtórzeń dla konkretnego punktu doświadczenia zostało wziętych do analizy statystycznej?

W mojej konkluzji na temat całości pracy stwierdzam, iż jest to bardzo wartościowy materiał badawczy. Wyniki pracy mają dużą wartość translacyjną i odpowiadają na ważne pytania dotyczące powodzenia leczenia onkologicznego. Szczególnie w tym aspekcie uważam pracę za bardzo pożyteczną. Na uwagę zasługuje także wysokiej klasy warsztat badawczy Doktorantki i zapewne całego laboratorium, w którym powstała praca. Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2021 poz. 478, 619, 1630) i wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Joanny Domagały do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie pracy ze względu na praktyczne implikacje przeprowadzonych badań oraz fakt, iż wyniki zostały już częściowo opublikowane w dobrym piśmie międzynarodowym. Poznanie czynników warunkujących gotowość pacjenta do terapii, a także możliwy brak odpowiedzi na leczenie ze względu na towarzyszące chorobie procesy patofizjologiczne to istotna część sukcesu każdej terapii. Jest to także istotny czynnik pozwalający na indywidualne podejście do leczenia i zwiększający szanse pacjenta na wyleczenie. Nadal niewiele o tym wiemy, a praca Doktorantki jest z pewnością krokiem naprzód w poznaniu takich mechanizmów.

**K I E R O W N I K**

Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej  
Gdański Uniwersytet Medyczny



*prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski*