

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

Gdańsk 20.08.2018

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Marty Kłopotowskiej: " Zbadanie wpływu wybranych mechanizmów antyoksydacyjnych na aktywność komórek NK"

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska to bardzo dobrze wykonane badanie laboratoryjne, w którym Autorka oceniała wpływ stresu oksydacyjnego na aktywność komórek NK oraz mechanizmy chroniące te komórki przed takim stresem. W szczególności Doktorantka zajęła się wpływem stresu oksydacyjnego na przeżycie i funkcje komórek NK, procesem regulacji ilości peroksyredoksyny 1 (PRDX1) w tych komórkach oraz wpływem tego enzymu na przeżycie natywnych komórek NK oraz komórek NK-CAR w warunkach stresu oksydacyjnego. Autorka wykazała, że komórki te są szczególnie wrażliwe na stres oksydacyjny oraz że układ enzymatyczny, którego elementem jest PRDX1 działa na nie protekcyjnie w takich warunkach. Jest to cenna wiedza przedkliniczna, która może pomóc w zwiększeniu skuteczności terapii przeciwnowotworowych wykorzystujących bezpośrednio komórki NK lub leki zwiększające ich aktywność.

Układ pracy jest typowy. Autorka rozpoczyna wstępem, w którym omawia biologię komórek NK, ich znaczenie w odporności przeciwnowotworowej oraz możliwości modyfikacji tych komórek w terapii przy pomocy chimericznych receptorów CAR (z ang. chimeric antigen receptor). Następnie omawia mikrośrodowisko guza i elementy, które w tym środowisku mogą zmniejszać aktywność komórek NK ze szczególnym podkreśleniem stresu oksydacyjnego. W końcu opisuje mechanizmy antyoksydacyjne komórek. Przedstawiona wiedza jest aktualna i podparta nowoczesną literaturą. Następnie Doktorantka wyklada cele i założenia pracy.

Kolejny rozdział dotyczy metod i opisuje techniki jakimi posługiwała się Doktorantka. Rozdział jest napisany bardzo szczegółowo i pozwala w dużej mierze na odtworzenie doświadczeń na podstawie przedstawionych opisów. Oprócz standardowych technik używanych w tego typu pracach, Autorka posługiwała się również bardzo nowoczesnymi technikami tworzenia komórek CAR oraz edycją genomu techniką CRISPR/Cas9.

Następnie Autorka przedstawiła uzyskane wyniki. W pierwszym rozdziale pokazano wyniki wpływu stresu oksydacyjnego indukowanego oksydazą glukozową lub askorbinianem sodu na przeżycie limfocytów T, B i NK. Wykazano, iż najbardziej wrażliwą populacją są komórki NK. Kolejnym pomiarem było określenie ilości PRDX1 i TXN1 (tioredoksyna) w tych populacjach. Autorka wykazała najniższą ilość tych enzymów w komórkach NK w porównaniu do innych populacji limfocytów, szczególnie w populacji CD56dim. W kolejnym kroku zbadano funkcje efektorowe komórek NK pod wpływem stresu oksydacyjnego stwierdzając istotny spadek cytotoksyczności, degranulacji i produkcji IFN po potraktowaniu hodowli wysokimi stężeniami oksydazy glukozowej. Autorka następnie wykazała, iż indeksując do komórek CD56dim. najwyższe stężenia spośród enzymów redoks osiągają w aktywowanych komórkach NK właśnie PRDX1 oraz tioredoksyna (TXN1) i reduktaza tioredoksyny (TXNRD), natomiast fizjologicznym sposobem zwiększenia ekspresji tych enzymów jest szlak IL15 poprzez białko mTOR. Następnie przy użyciu adenantyny, tj. inhibitora PRDX1, TXN1 oraz TXNRD1, Doktorantka wykazała, iż zahamowanie tego szlaku metabolicznego istotnie upośledza funkcje cytotoksyczne, zdolność do degranulacji i produkcji cytokin przez komórki NK nie wpływając na żywotność tych komórek w badanych stężeniach. Efekty te potwierdzono częściowo na linii komórkowej NK-92 z usuniętym genem *PRDX1*, w szczególności wykazano zwiększoną wrażliwość knockoutowanych komórek na stres oksydacyjny ale bez efektu na cytotoksyczność. Wykazano też, że zwiększona ekspresja tego enzymu lepiej chroni przed stresem oksydacyjnym zarówno linię komórkową, jak i natywne komórki NK. Ostatnią częścią rozdziału były doświadczenia z komórkami NK z receptorem CAR-CD19. Doświadczenia z optymalizacją procesu wykazały skuteczność elektroporacji jako sposobu transfekcji, natomiast stabilność ekspresji utrzymywała się jedynie kilka dni, szczególnie w komórkach proliferujących. W takim oknie czasowym prowadzono doświadczenia. Wykazano, że transfekcja konstruktem istotnie poprawia funkcje komórek NK, natomiast jednoczesna transfekcja mRNA dla PRDX1 poprawiała też oporność komórek NK-CAR (także linii NK92) na stres oksydacyjny.

Ostatnim dużym rozdziałem rozprawy doktorskiej jest dyskusja. Doktorantka w sprawny sposób omówiła tu swoje wyniki w konfrontacji z dostępnymi danymi innych zespołów. Podobnie jak we wstępie jest to dobrze napisany rozdział z odniesieniami do aktualnej i adekwatnej literatury cytowanej w bibliografii. Pracę kończą wnioski podsumowujące uzyskane wyniki. Zdecydowanie zgadzam się z Autorką, iż szczegółowa analiza mechanizmów zmieniających aktywność limfocytów naciekających guz jest środkiem do zwiększenia skuteczności immunoterapii w onkologii. Przedstawiona mi do recenzji praca jest bardzo dobrym przykładem, iż immunometabolizm jest jednym ze szczególnie godnych polecenia elementów takiej analizy.

Nie znajduję w pracy zasadniczych błędów, natomiast z ciekawości naukowej chciałbym prosić o odpowiedzi na pytania dotyczące wykonania pracy:

1. Czy wysokie stężenia oksydazy glukozowej i efekty jej aktywności używane w pracy (np. graniczne dla efektów 0.5mU/ml) są możliwe do uzyskania w guzie albo w innych warunkach *in vivo*? Na jakiej podstawie dobrano stężenia oksydazy glukozowej? Z drugiej strony dość niepokojący jest zaobserwowany toksyczny efekt askorbinianu na komórki NK dla niskich dawek tego związku (LD50 już dla 50uM związku). Czy witamina C daje takie efekty w dawkach terapeutycznych?
2. Czy spadek funkcji komórek NK w doświadczeniu w rozdziale 4.4. nie jest jedynie efektem uszkodzenia tych komórek i ich nekrozy w wysokich stężeniach oksydazy glukozowej? Czy po inkubacji z oksydazą, nie należało poczekać kilka godzin przed testami, aby umożliwić obumarciu uszkodzonych komórek i rzeczywiście wybrać do testu żywe komórki? Czy badana była funkcja innych limfocytów w tych samych stężeniach oksydazy?
3. Dlaczego w wynikach niektórych testów używany jest błąd standardowy (SEM), a nie odchylenie standardowe (np. ryc. 11, 13, 20, 37, 50)?
4. Użyta adentadyna oraz związki do doświadczeń ze szlakiem mTOR rapamycyna, torin1, CAL-101, IPI-145 są słabo rozpuszczalne w wodzie i muszą być rozpuszczone w DMSO. Jakie były końcowe stężenia DMSO w poszczególnych kondycjach w eksperymencie? Jaki był wpływ rozpuszczalnika na żywotność?

Oceniając pracę całościowo należy uwypuklić jej adekwatność do współczesnych poszukiwań nowych terapii onkologicznych. Immunoterapia stała się w ostatnich latach potężnym sposobem walki z nowotworami. Dociekliwa analiza mechanizmów zwiększających skuteczność odpowiedzi immunologicznej na nowotwór jest w związku z tym krytycznie ważna dla doskonalenia tej terapii. Chciałbym też podkreślić duży wkład pracy w uzyskanie przedstawionych wyników oraz biegłość Autorki w różnorodnych technikach laboratoryjnych, także najnowszych narzędzi takich jak CRISPR/Cas9 oraz generowanie komórek CAR.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz. 882 z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie magister Marty Kłopotowskiej do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego o wyróżnienie pracy ze względu na jej wartości merytoryczne i warsztatowe. Bardzo podoba mi się pomysł pracy, który pozwala rozwijać zarówno dalsze badania podstawowe w zakresie mikrośrodowiska guza, jak i implikacje kliniczne wyników. Szczególnie zachęcałbym do dalszych prac z komórkami CAR i terapią adoptywną. Unikalne doświadczenia zdobyte przy realizacji przewodu doktorskiego mogą zapewne posłużyć do szybszego stosowania tych komórek w praktyce klinicznej w naszym kraju. To ultranowoczesna wiedza, którą należy wykorzystać.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Klinicznej
i Transplantologii



Prof. dr hab. med. Piotr Trzankowski