

**mgr Marta Kłopotowska**

**Zbadanie wpływu wybranych mechanizmów antyoksydacyjnych  
na aktywność komórek NK**

**Streszczenie**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w zakresie biologii medycznej**

Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Winiarska

Zakład Immunologii

Warszawski Uniwersytet Medyczny



**Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą I Wydziału Lekarskiego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Warszawa 2018**

## Streszczenie

### Zbadanie wpływu wybranych mechanizmów antyoksydacyjnych na aktywność komórek NK

W ostatnich latach zastosowanie komórek układu odpornościowego w leczeniu chorób nowotworowych zyskuje na znaczeniu. Komórki NK należą do komórek układu odpornościowego wykazujących naturalne właściwości rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych lub zakażonych wirusem. Ze względu na swoje mechanizmy cytotoksyczne, komórki NK mogą być stosowane w terapiach adoptywnych, w których chorym podaje się komórki układu odpornościowego w celu zwalczania choroby nowotworowej. Ponadto komórki NK mogą być poddawane modyfikacji chimerycznymi receptorami antygenowymi (CAR - *chimeric antigen receptors*). Obecnie zarejestrowanych jest kilkadziesiąt badań klinicznych z wykorzystaniem komórek NK w leczeniu nowotworów, w tym kilka badań wykorzystujących komórki CAR-NK lub linię komórkową NK-92 modyfikowaną CAR. Jednym z czynników ograniczających efektywne przeciwnowotworowe działanie komórek NK są niekorzystne warunki mikrośrodowiska nowotworu związane między innymi z nadmiernym stresem oksydacyjnym. Doniesienia literaturowe wskazują, że komórki NK należą do komórek o zwiększonej wrażliwości na stres oksydacyjny. Z tego względu dokładne poznanie mechanizmów antyoksydacyjnych, które mogą chronić komórki NK przed działaniem stresu oksydacyjnego ma duże znaczenie. W niniejszej pracy zbadano wpływ wybranych mechanizmów antyoksydacyjnych na aktywność komórek NK i przeżycie w warunkach stresu oksydacyjnego.

Szczegółowe cele pracy doktorskiej obejmowały zbadanie:

- wpływu stresu oksydacyjnego na przeżycie oraz funkcje efektorowe komórek NK;
- procesów regulacji ilości PRDX1 w komórkach NK;
- wpływu zahamowania PRDX1 na przeżycie komórek NK oraz ich funkcje efektorowe;
- wpływu zwiększonej ilości PRDX1 w komórkach NK na ich przeżycie w warunkach stresu oksydacyjnego;
- wpływu zwiększenia ilości PRDX1 w komórkach CD19-CAR NK na ich przeżycie w warunkach stresu oksydacyjnego.

Wszystkie doświadczenia wykonano w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem pierwotnych komórek NK izolowanych od zdrowych dawców lub linii komórkowej NK-92. Naturalną cytotoksyczność komórek NK oceniano metodą CFSE/PI z wykorzystaniem linii nowotworowej K562. Cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (ADCC) badano względem komórek Raji oplaszczonych rytuksymabem. Degranulację oraz wytwarzanie

cytokin przez komórki NK badano z wykorzystaniem wielokolorowych barwień cytometrycznych.

W celu indukcji stresu oksydacyjnego *in vitro* zastosowano oksydazę glukozową i askorbinian sodu. Do zahamowania aktywności układu peroksyredoskyna1-tioredoksyna1-reduktaza tioredoksyny1 (PRDX1-TXN1-TXNRD1) wykorzystano adenantynę. Zwiększenie ilości białka dla PRDX1 w komórkach NK uzyskano metodą transdukcji lentiwirusowej lub metodą elektroporacji zszyntetyzowanym *in vitro* mRNA. W celu obniżenia poziomu PRDX1 w komórkach NK-92 wykorzystano metodę edycji genomu CRISPR/Cas9 oraz transdukcję lentiwirusową. Zmiany w ilości wybranych enzymów antyoksydacyjnych oceniano metodą qRT-PCR, Western blotting oraz PrimeFlow RNA.

Uzyskane wyniki wskazują na szczególną wrażliwość komórek NK na działanie stresu oksydacyjnego w porównaniu do innych populacji limfocytów krwi. Zaobserwowano, że zahamowanie układu PRDX1-TXN1-TXNRD1 upośledza cytotoksyczność komórek NK, ich degranulację oraz wytwarzanie cytokin. Wykazano, że zwiększenie ilości PRDX1 znacznie poprawia przeżycie komórek NK oraz komórek CAR-NK w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, co może przekładać się na lepszą efektywność komórek NK w warunkach stresu oksydacyjnego. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń mogą w przyszłości znaleźć potencjalne zastosowanie praktyczne w terapiach adoptywnych z wykorzystaniem komórek NK.

Marta Kłopotowska

M. Winiarska