



Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Ul. Dębinki 7, bud. 27, II piętro, 80-211 Gdańsk
Tel. 58 3491590, 1593 fax 58 3491591
e-mail: piotr.trzonkowski@gumed.edu.pl

Gdańsk 02.01.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Mieszko Krzysztofa Lachoty: „Badanie profilu migracji komórek NK i poszukiwanie metody poprawiającej ich infiltrację w terapii nowotworów litych”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska to praca doświadczalna, której celem była ocena czynników odpowiedzialnych za ograniczoną skuteczność przeciwnowotworową limfocytów NK. Doktorant dokonał charakterystyki profilu migracyjnego podtypów komórek NK i opisał zjawisko wykluczania komórek NK z mikrośrodowiska guzów litych zależnego od profilu chemokin. Zasadniczym wnioskiem pracy jest określenie profilu receptorów, które mogłyby zostać użyte do ‘dozbrojenia’ tych komórek, aby były one bardziej skuteczne w walce z guzem.

Praca ma układ nowoczesnej rozprawy doktorskiej, tj. składa się z trzech opublikowanych już prac, z czego dwie to prace przeglądowe, a jedna to praca doświadczalna. Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie prace opublikowane zostały w bardzo dobrych pismach międzynarodowych posiadających historię cytowań (IF) oraz wymóg recenzji przed publikacją. W pewnym sensie odciąża to recenzenta pracy doktorskiej, ponieważ przynajmniej sześciu anonimowych recenzentów i trzech edytorów oceniało wyniki wcześniej i dopuściło je do publikacji.

Dwie pierwsze prace [Prospects for NK Cell Therapy of Sarcoma. *Cancers* 2020; 12, 3719 oraz The Tumor Microenvironment—A Metabolic Obstacle to NK Cells’ Activity. *Cancers* 2020; 12, 3542] to prace przeglądowe, w których zawarta jest aktualna wiedza dotycząca głównego tematu. W pierwszej omówiona jest rola komórek NK w nadzorze immunologicznym mięsaków, jak również mechanizmy unikania tego nadzoru przez mięsaki. Zgodnie tą literaturą zasadnicze mechanizmy to: zwiększona ekspresja HLA klasy I, złuszczenie z powierzchni ligandów



Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Ul. Dębinki 7, bud. 27, II piętro, 80-211 Gdańsk
Tel. 58 3491590, 1593 fax 58 3491591
e-mail: piotr.trzonkowski@pum.edu.pl

aktywujących komórki NK, zmieniony profil metabolomiczny mikrośrodowiska oraz obecność immunosupresyjnych cytokin. Artykuł odnosi się następnie do tych mechanizmów w kontekście możliwości modyfikacji komórek NK, które zwiększałyby ich aktywność przeciwnowotworową na różnych poziomach interakcji z komórką nowotworową i podścieliskiem. Przedyskutowano też możliwości zwiększenia sensytyzacji komórek mięsaków na komórki NK za pomocą przeciwciał monoklonalnych, radioterapii czy hipertermii. W drugim artykule przeglądowym podsumowano w jaki sposób mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej wykorzystywane przez różne guzy lite wpływają na poszczególne funkcje efektorowe komórek NK. Wskazano, że do tych mechanizmów należą hipoksja, zmniejszone pH, stres oksydacyjny, immunosupresyjne cytokiny, ograniczenie dostępności aminokwasów, immunosupresyjne metabolity lipidów czy też metabolity adenozyiny. Także w tym artykule zostały omówione strategie, które mogłyby zwiększyć aktywność komórek NK w odpowiedzi na opisane warunki mikrośrodowiska.

Zasadniczą publikacją rozprawy doktorskiej jest praca doświadczalna „Mapping the Chemotactic Landscape in NK Cells Reveals Subset-specific Synergistic Migratory Responses to Dual Chemokine Receptor Ligation” [eBioMedicine 2023; 96]. W pracy tej zbadano wzorce migracji komórek NK w kontekście utrudnionej migracji tych komórek do guza. Opisano zjawisko zmiany repertuaru receptorów chemokinowych komórek NK z krwi obwodowej wraz z progresją guza. Wykazano, że ekspresja receptorów chemokinowych jest ściśle związana ze zdolnością do migracji poszczególnych podtypów komórek NK. W szczególności, jednoczesna aktywacja receptorów CXCR1/2 i CX3CR1 prowadzi do wzmożonej migracji. Odniesienie tych badań do materiału bazy danych prawie 10000 próbek nowotworów pozwoliła na opisanie dziewięciu dominujących profili ekspresji chemokin, różniących się w zależności od typu guza. W żadnym z tych profili nie było ligandów dla więcej niż jednego receptora chemokinowego obecnego na dojrzałych komórkach NK. Zjawisko to jest doskonałym wytłumaczeniem dlaczego środowisko zaawansowanego nowotworu jest zubożone w dojrzałe komórki NK.



Wyniki te stanowią doskonały punkt wyjścia dla manipulacji genetycznych w celu użycia komórek NK w skuteczniejszej immunoterapii komórkowej nowotworów. Na szczególną uwagę zasługuje nowoczesna metodyka pracy. Autorzy użyli wieloparametrycznej cytometrii przepływowej, cytometrii masowej CyTOF i sekwencjonowania RNA na poziomie pojedynczych komórek. Wyniki tych badań zostały zweryfikowane w testach funkcjonalnych.

Układ doświadczeń w pracy jest właściwy i adekwatny do stawianych hipotez. Wnioski są poparte uzyskanymi wynikami. Nie znalazłem istotnych pomyłek lub błędów. Bardziej w kontekście dyskusji aniżeli wytykania błędów chciałbym zapytać Doktoranta o pewne aspekty uzyskanych wyników:

1. Dlaczego używano w pracy komórek iNK? Jaka jest istotna wyższość tego typu materiału wyjściowego nad autologicznymi NK? Jakie są potencjalne zagrożenia użycia komórek iNK według Doktoranta?
2. W użytej bazie TCGA i TARGET pod uwagę wzięto bardzo różne nowotwory weryfikując wzory chemokinowe i uzyskując w różnych nowotworach różne wzory. Jakie i czy było założenie a priori tych poszukiwań? Czy zróżnicowanie wzorów w poszczególnych nowotworach powoduje, że przy ewentualnej immunoterapii musiałyby być wdrożone jakieś procedury diagnostyczne w celu określenia konkretnego wzoru u konkretnego pacjenta przed zastosowaniem immunoterapii? Jak wyglądałyby takie testy?
3. Czy opisane wzory chemokinowe ewoluują w zależności od zaawansowania procesu nowotworowego lub sposobu leczenia?
4. Praca 'zatrzymuje' się na etapie *in vitro* i analizie bazy danych. Czy praca ma ciąg dalszy w modelach zwierzęcych lub z wykorzystaniem technik kontrolowanej ekspresji genów, np. knock-out genów dla chemokin, wyciszanie tych genów przy pomocy siRNA?



Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Ul. Dębinki 7, bud. 27, II piętro, 80 -211 Gdańsk
Tel. 58 3491590, 1593 fax 58 3491591
e-mail: piotr.trzonkowski@gumed.edu.pl

W konkluzji uważam wyniki za oryginalne, w szczególności ich potencjalny praktyczny aspekt, który może dać początek nowym strategiom immunoterapii z wykorzystaniem modyfikowanych komórek NK. Na uwagę zasługuje bardzo dobry warsztat badawczy Autora i – jak rozumiem z wyróżnienia 'Diamentowym Grantem' – rozpoczęcie tych badań jeszcze na etapie studiów medycznych. Nie mam uwag krytycznych.

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 lekarza Mieszko Krzysztofa Lachoty do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie pracy ze względu na jej praktyczne aspekty. Wyniki te mogą stać się w przyszłości zaczątkiem nowych form immunoterapii nowotworów. Na uwagę zasługują też nowoczesne metody badawcze zwiększające precyzję wyników. Dodałbym także niewątpliwie duży wkład własny Autora od czasu studiów, o czym świadczy finansowanie pracy z programu „Diamentowy Grant”. Niebagatelnym jest też fakt, iż wyniki zostały już opublikowane w dobrych pismach międzynarodowych, a w publikacji oryginalnej Doktorant jest pierwszym autorem. Praca jest przykładem translacyjnego podejścia, jakiego powinniśmy sobie życzyć w każdej pracy doktorskiej opisującej mechanizmy chorób człowieka.

Piotr Trzonkowski