



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Kingi Godkowicz pt. „Aktywność komórek NK w mikrośrodowisku komórek starzejących”.

Rozprawa doktorska mgr Kingi Godkowicz omawia ważne i mało poznane aspekty związane z mechanizmem starzenia komórek nowotworowych w trakcie terapii oraz ich udział w modulowaniu mikrośrodowiska nowotworu. Wyniki dotychczasowych badań oceny wpływu fenotypu wydzielniczego związanego ze starzeniem komórek nowotworowych na skuteczność terapii, w tym immunoterapię, w ograniczonym zakresie definiują mechanizmy odpowiedzialne za aktywność przeciwnowotworową komórek układu immunologicznego. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza dotycząca oceny wpływu mikrośrodowiska nowotworowych komórek starzejących na aktywność komórek NK w warunkach *in vitro* jest w pełni uzasadniona.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Kingi Godkowicz jest monografią podzieloną na konwencjonalnie przyjęte rozdziały, które ilustrują 23 ryciny, 6 schematów, 7 tabel oraz 251 pozycji piśmiennictwa. Od strony formalnej przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu pracom. Stanowi spójne opracowanie zawierające wyniki badań przeprowadzone przez Doktorantkę i przedstawione w kontekście założeń pracy i celów badań w odniesieniu do dotychczasowej wiedzy w obszarze badawczym ujętym w pracy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

We wstępie rozprawy doktorskiej Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy związany ze zjawiskiem starzenia komórkowego, które może być wywołane terapią przeciwnowotworową. Wnikliwie omawia metabolizm komórek starzejących oraz fenotyp wydzielniczy SASP związany ze starzeniem komórkowym. Autorka naświetla możliwości

eliminacji nowotworowych komórek starzejących z wykorzystaniem leków indukujących śmierć komórek starzejących, koncentrując się na charakterystyce i skuteczności wybranych związków. Ostatnią częścią wstępu są rozważania nad udziałem komórek NK w eliminacji starzejących komórek nowotworowych. Wstęp pracy doktorskiej to dobrze skonstruowane kompendium dotychczasowej wiedzy dotyczące tematu opracowanego przez Doktorantkę dające wyraz Jej doskonałemu przygotowaniu i zgłębieniu problemu badawczego.

Należy podkreślić, że mgr Kinga Godkowicz we wnikliwy i przekonujący sposób uzasadnia celowość podjętych badań będących podstawą pracy doktorskiej. **Cel pracy jest ambitny i jasno sformułowany.** Autorka bada aktywności komórek NK w środowisku nowotworowych komórek starzejących indukowanych chemioterapeutykami z uwzględnieniem fenotypu wydzielniczego komórek starzejących SASP. Porównanie odpowiedzi cytotoksycznej komórek linii NK-92 wobec nowotworowych komórek starzejących indukowanych chemioterapią i komórek kontrolnych oraz określenie roli fenotypu wydzielniczego komórek starzejących w modulowaniu efektu cytotoksycznego komórek NK-92 ma dać odpowiedź na założenia pracy.

Doktorantka przeprowadziła badania w oparciu o ludzkie nowotworowe linie komórkowe oraz komórki prawidłowe. Z ośmiu badanych linii komórkowych litych ludzkich nowotworów linia raka pęcherza HCV29, oraz niedrobnokomórkowego raka płuc A549 zostały wybrane przez Doktorantkę i stanowiły model badawczy wykorzystany do oceny efektu cytotoksycznego komórek NK-92 z uwzględnieniem fenotypu wydzielniczego komórek starzejących.

Opis części metodycznej pracy ilustrowany schematami jest na tyle obszerny, że pozwala na precyzyjną ocenę metodologii pracy oraz wachlarza zastosowanych metod i technik badawczych, którymi Doktorantka posłużyła się do realizacji poszczególnych etapów badań eksperymentalnych. Procedury ko-hodowli i standardowej hodowli komórek oraz izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej zostały właściwie dobrane i przeprowadzone. Ocena żywotności komórek, profilu wydzielniczego, aktywności β -galaktozydazy, cech morfologicznych komórek starzejących oraz ocena cytotoksyczności komórek NK-92 została przeprowadzona przy użyciu właściwie dobranych metod i technik m.in. metody histochemicznej, cytometrii przepływowej, technik fluorescencyjnych, testów ELISA. Wybór technik i procedur badawczych wykorzystanych w poszczególnych eksperymentach badawczych nie budzi zastrzeżeń merytorycznych i wskazuje na dobre przygotowanie Doktorantki do prowadzenia pracy badawczej. Tak metodologicznie

zaplanowany cykl badań oparty o nowoczesne techniki badawcze stanowi podstawę do uzyskania wiarygodnych wyników.

Uzyskane wyniki zostały udokumentowane licznymi rycinami i mikrofotografiami. Opracowanie powtarzalnych procedur oraz wybór właściwego modelu badawczego indukcji starzenia komórkowego był podstawą uzyskania wiarygodnych wyników potwierdzonych analizą statystyczną. W oparciu o wstępne wyniki indukcji starzenia komórkowego ośmiu linii komórkowych z wykorzystaniem inhibitorów topoizomerazy do dalszych badań Doktorantka wytypowała linie raka płuc A549, raka pęcherza HCV29, raka piersi MCF-7. Efektywność indukcji starzenia komórkowego linii HCV29, A549, MCF-7 z wykorzystaniem etopozydu, Autorka analizowała oceniając aktywność β -galaktozidazy, cechy morfologiczne komórek nowotworowych, fazy cyklu komórkowego oraz fenotyp wydzielniczy SASP. Traktując komórki linii HCV29, A549 i MCF-7 etopozydem, Doktorantka zanotowała, że linie nie tylko wykazują zwiększoną aktywność β -galaktozidazy ale również widoczne są zmiany w morfologii komórek nowotworowych takie jak powiększone jądro komórkowe, obecność ziarnistości w cytoplazmie, wzrost liczby jąder w komórce. Zastosowana przez Doktorantkę procedura indukcji starzenia komórkowego umożliwiła uzyskanie populacji komórek wykazujących fenotyp komórek starzejących. Przeprowadzając analizę cyklu komórkowego linii HCV29, A549 oraz MCF-7 oraz ocenę fenotypu wydzielniczego związanego ze starzeniem komórkowym, Autorka stwierdziła w liniach HCV29 i A549 zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, a w linii MCF-7 wzrost apoptozy. Fenotyp wydzielniczy starzejących komórek trzech analizowanych linii komórkowych był zróżnicowany, przy czym najwyższy potencjał wydzielniczy wyrażony wysokim poziomem IL-8 i VEGF zanotowano w komórkach linii HCV29, niższy w liniach A549 i MCF-7. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę jednoznacznie wskazują na indukcję stabilnego fenotypu starzejących komórek w linii HCV29, A549, przy braku cech starzenia w linii MCF-7. Odnosząc się do uzyskanego wyniku Autorka uważa, że niestabilny fenotyp starzenia komórkowego linii MCF-7 może być konsekwencją wzrostu apoptozy indukowanej terapią. Oceniając efekt cytotoksyczności komórek NK-92 na modelu indukowanych terapią starzejących komórek linii HCV29 i A549, Doktorantka nie uzyskała jednoznacznych wyników wskazujących istotny wpływ starzenia na uwrażliwienie komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Dalsze badania Doktorantki koncentrowały się na analizie wieloetapowego procesu cytotoksycznego komórek NK-92 wobec starzejących komórek linii HCV29 od rozpoznania komórek docelowych poprzez ocenę ligandów dla komórek NK-92, aż do oceny stopnia uwalniania ziarnistości cytolitycznych przez komórki

NK-92. Przeprowadzając analizę wieloetapowej odpowiedzi komórek NK-92 wobec starzejących komórek linii HCV29 oraz w grupie kontrolnej, Autorka wykazała, że starzenie komórek nowotworowych nie zwiększa ich podatności na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 ale zwiększa chemotaksję komórek NK-92 wobec starzejących komórek docelowych.

Ważnym elementem pracy była ocena wpływu fenotypu wydzielniczego komórek starzejących SASP na aktywność komórek NK-92. Do wykazania wpływu fenotypu starzejących komórek nowotworowych HCV29 i A549 na komórki NK-92, Doktorantka wykorzystała medium kondycjonowane znad komórek kontrolnych (CM) i komórek starzejących SASP. Interesujących danych dostarczyła analiza cech morfologicznych, żywotności, aktywności i cytotoksyczności komórek NK-92 hodowanych w medium suplementowanym SASP. Autorka udokumentowała negatywny wpływ SASP na żywotność, efekt cytotoksyczny oraz aktywność komórek NK-92 wyrażoną wzrostem ekspresji receptorów hamujących na komórkach NK-92. Oryginalnych wyników dostarczyła ocena wpływu medium CM i SASP na wyizolowane jednojądrzaste komórki krwi obwodowej oraz na wyodrębnioną populację komórek NK CD56+. Istotnym spostrzeżeniem Doktorantki było stwierdzenie, że jednojądrzaste komórki krwi i pierwotne komórki NK są bardziej odporne na spektrum molekuł pochodzących z SASP aniżeli komórki linii NK-92.

Ważną obserwacją wynikającą z badań dotyczących oceny profilu SASP w medium znad linii HVC29 i A549 było stwierdzenie wysokiego poziomu cytokin prozapalnych i czynników modulujących odpowiedź immunologiczną. Wykazanie zróżnicowanego profilu SASP w medium analizowanych linii komórkowych zdaniem Autorki jest cechą osobniczą nowotworowych komórek starzejących.

Dyskusja oparta o najistotniejsze pozycje piśmiennictwa, głównie opracowania publikowane w ostatnim dziesięcioleciu jest merytorycznie uzasadniona. Autorka akcentuje własne poglądy dotyczące wartości uzyskanych wyników, jednocześnie wskazując, że liczba opracowań na temat wpływu starzenia komórkowego na cytotoksyczność komórek NK jest ograniczona. Doktorantka umiejętnie wykorzystuje dotychczasowe opracowania do omówienia własnych wyników w relacji z danymi innych autorów, podkreślając wartość uzyskanych wyników oraz poznawczy charakter prowadzonych badań. Sposób prowadzenia dyskusji, mnogość omawianych zagadnień dotyczących interakcji pomiędzy komórką starzejącą, a komórką NK z uwzględnieniem roli ligandów komórek docelowych i receptorów powierzchniowych komórek NK, wpływu fenotypu wydzielniczego komórek starzejących na aktywność komórek NK, omawia wnikliwie wskazując na ich kliniczne znaczenie. Autorka omawiając różnice między wynikami przedstawionymi w pracy

doktorskiej, a danymi innych autorów twierdzi, że mogą one zależeć od wyboru modelu eksperymentalnego oraz warunków prowadzenia hodowli komórkowych. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowanych zostało 6 wniosków będących wypadkową przeprowadzonych badań eksperymentalnych, które stanowią wyczerpującą odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze.

Uwagi krytyczne

Tabela na stronie 43 przedstawiająca linie komórkowe powinna być opatrzona numerem. Na stronie 69 i w legendzie Figury 7 w opisie, Doktorantka używa określenia „powiększenie powierzchni jąder komórkowych” jest to sformułowanie niepoprawne. W ocenie cytologicznej używa się określenia wielkość jądra. Konstrukcja dyskusji jest prawidłowa, słabym elementem dyskusji są szczegółowe opisy wyników. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski są odpowiedzią na cele badawcze. Uzupełnienie każdego wniosku fragmentem wyników nie jest uzasadnione ponieważ wniosek ma być konkluzją wynikającą z badań. W przygotowaniu wyników do publikacji należy rozważyć przeredagowanie wniosków.

Podsumowanie. Uważam, że praca doktorska mgr Kingi Godkiewicz wnosi istotny wkład w poznanie oddziaływań mikrośrodowiska starzejących komórek nowotworowych na aktywność komórek NK. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do prowadzenia dalszych badań ukierunkowanych na zwiększenie efektu cytotoksycznego komórek układu immunologicznego, w tym komórek NK.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) oraz wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wrocław, 30.12.2025 r.



Signed by /
Podpisano przez:
Julia Krystyna Bar
Julia Bar
Date / Data:
2025-12-30
13:04