



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Godkowicz, pt. *Aktywność komórek NK w mikrośrodkowisku komórek starzejących* wykonanej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Zakład Onkologii Doświadczalnej

Laboratorium Immunologii Molekularnej Nowotworów

Promotor: dr hab. Wojciech Kałas

Recenzent: dr hab. Alicja Warowicka

**Rada Naukowa Instytutu
Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
we Wrocławiu**

1. Tematyka rozprawy

Tematyka przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej p. mgr Kingi Godkowicz dotyczy starzenia się (senescencji) komórek nowotworowych w kontekście wykorzystania tego zjawiska w terapiach przeciwnowotworowych. Głównym celem prowadzonych przez Doktorantkę badań była analiza aktywności komórek układu odpornościowego - komórek NK w środowisku starzejących się komórek nowotworowych, uwzględniając wpływ fenotypu wydzielniczego, tzw. profilu sekrecyjnego związanego ze starzeniem SASP (ang. *Senescence-associated secretory profile*). Realizując te badania mgr Kinga Godkowicz wyznaczyła cele szczegółowe/pośrednie, tj:

1) zbadała aktywność cytotoksyczną komórek NK względem starzejących się komórek nowotworowych indukowanych chemioterapeutykami etopozydem oraz względem komórek nietraktowanych, analizując m.in. potencjał formowania się koniugatów między komórką NK a komórką docelową i dynamikę tych interakcji, ekspresję ligandów cytotoksyczności na komórkach starzejących się czy poziom degranulacji komórek NK-92

2) zbadała działanie czynników wydzielanych przez nowotworowe komórki starzejące się (profil sekrecyjny SASP) na aktywność komórek NK i poziom ekspresji receptorów cytotoksyczności na ich powierzchni.

Modelem badawczym cytotoksycznych komórek NK była linia komórkowa NK-92, natomiast proces starzenia się indukowano etopozydem w komórkach linii niedrobnokomórkowego raka płuca A549 i komórkach linii raka pęcherza HCV29. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wykazały, że indukcja starzenia komórkowego nie zwiększa aktywności cytotoksycznej komórek NK-92 względem komórek linii A549 i HCV29, profil wydzielniczy SASP obniża żywotność i cytotoksyczność komórek NK-92, natomiast nie wpływa na żywotność i aktywność pierwotnych komórek NK izolowanych z krwi obwodowej człowieka.

Zjawisko starzenia komórek nowotworowych jako odpowiedź na działanie chemioterapeutyków, czyli tzw. starzenie indukowane terapią (w skrócie TIS, ang. *Therapy Induced Senescence*) jest obecnie

szeroko badane jako proces alternatywny do apoptozy komórek nowotworowych. Te dwa zjawiska, starzenie się komórek bądź ich programowana śmierć (apoptoza) leżą u molekularnych podstaw odpowiedzi komórek na terapię. W starzeniu indukowanym terapią celem jest trwałe zahamowanie podziałów komórki, niemniej jednak komórki starzejące się pozostają metabolicznie aktywne, nie umierają. Charakterystyczny jest profil sekrecyjny nowotworowych komórek starzejących się, ponieważ wydzielają one szereg czynników mogących doprowadzić do transformacji nowotworowej komórek sąsiadujących (działanie pronowotworowe) lub wykazać działanie immunosupresyjne. Ponadto, komórki te są w stanie po pewnym czasie senescencji wznowić podziały. W związku z tym, dla doskonalenia terapii przeciwnowotworowych, niezwykle ważne stają się badania nad unieczynnianiem i eliminacją nowotworowych komórek starzejących się w ustroju, a tę rolę przypisuje się komórkom układu immunologicznego. Wśród komórek odpornościowych kluczową grupą, z perspektywy terapii przeciwnowotworowych, są wyspecjalizowane komórki NK (ang. natural killers), tzw. „naturalni zabójcy”, wykazujący aktywność cytotoksyczną wobec komórek nieprawidłowych, starzejących się, nowotworowych czy zakażonych wirusami. Aktywność cytotoksyczna kom. NK może być ograniczana przez czynniki SASP oraz przez obecność cząsteczek hamujących na powierzchni komórek przeznaczonych do „zniszczenia”. Ponieważ różne typy komórek nowotworowych wykazują odmienny profil wydzielniczy czynników SASP oraz profil i poziom ekspresji ligandów na ich powierzchni, niezwykle ważne jest poznanie mechanizmów regulujących aktywność kom. NK w kontekście podejścia senoterapeutycznego.

Z tego względu uważam, że podjęty przez Doktorantkę cel badań jest oryginalny, a uzyskane wyniki badań wnoszą istotną wiedzę jak wykorzystać proces starzenia komórkowego w terapiach przeciwnowotworowych.

2. Wiedza kandydata

Doktorantka realizując cele pracy wykazała się bardzo dobrą znajomością i umiejętnością wykorzystania w badaniach metod z dziedziny biologii molekularnej i biologii komórki. Wykonanie badań wymagało od Doktorantki szerokiej wiedzy z zakresu cytometrii przepływowej i mikroskopii fluorescencyjnej. Bardzo dobrą znajomość tematu potwierdzają zastosowane przez Doktorantkę testy i techniki badawcze, odpowiednio dobrane do realizacji założonych celów.

Wstęp, który poprzedza część eksperymentalną dysertacji napisany jest w sposób kompetentny, jasny, rzeczowy i dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia pracy. Doktorantka w zwięzły i przystępny sposób przedstawia zagadnienie starzenia komórkowego przybliżając cechy charakterystyczne komórek starzejących się. Doktorantka krótko i zwięźle opisuje procesy molekularne zachodzące podczas starzenia się komórek, przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący znaczenia indukcji starzenia w terapiach przeciwnowotworowych, działanie związków o charakterze senolityków czy senomorfików. We Wstępie pracy Doktorantka opisuje funkcje komórek NK w kontekście nadzoru immunologicznego i ich potencjał w senoterapii. Cennym uzupełnieniem jest opis wydzielanych przez komórki starzejące się czynników, tzw. SASP mogących modulować aktywność innych komórek. Sposób przedstawienia i opisu tych zagadnień w dysertacji, powołanie się na odpowiednie i aktualne źródła literaturowe dodatkowo potwierdza wysoki poziom wiedzy Doktorantki i umiejętność doboru treści. Dyskusja, podzielona na poszczególne zagadnienia, napisana jest dojrzałe i rzeczowo. W tej części pracy Doktorantka konfrontuje uzyskane wyniki z danymi opublikowanymi w literaturze przedmiotu. Całość pracy zamyka bogata bibliografia, obejmująca 271 pozycji, co świadczy o bardzo dobrej znajomości innych badań realizowanych w tej tematyce.

3. Samodzielność kandydata

Doktorantka w ramach realizacji pracy doktorskiej prowadziła badania w 3 głównych etapach, tj. w pierwszym etapie opracowała indukcję procesu starzenia w komórkach nowotworowych wykonując liczne badania wstępne, następnie potwierdziła fenotyp starzeniowy oraz w ostatniej fazie badań zbadła aktywność cytotoksyczną komórek NK wobec starzejących się komórek nowotworowych. Ponadto, określiła wpływ profilu wydzielniczego SASP na aktywność komórek NK. Na wyrażne podkreślenie zasługuje fakt opracowania przez Doktorantkę powtarzalnej procedury indukcji starzenia komórkowego, niezbędnej do wykonania kolejnych etapów badań *in vitro*, czyli wybranie odpowiedniego chemioterapeutyku i dobranie określonej jego dawki. Pozwoliło to Doktorantce na zawężenie liczby badanych linii komórkowych – najpierw do trzech linii komórkowych A549, HCV29 oraz MCF-7, a docelowo do badań wybrano linie raka płuca A549 i raka pęcherza HCV29, określenie docelowego stężenia etopozydu (2 μ M) oraz czasu ekspozycji komórek na ten chemioterapeutyk. Warto nadmienić, że opracowany przez Doktorantkę protokół starzenia dla linii A549 i HCV29 może być niezwykle cenną pomocą dla innych badaczy.

W dalszych etapach badań Doktoranta skupiła się na analizie markerów procesu starzenia, przeprowadzając:

- analizę aktywności β -galaktozydazy (SA- β -gal) różnymi metodami, stosując metody histochemiczną cytometrii przepływowej i mikroskopii fluorescencyjnej;
- ocenę fenotypu komórek poddanych starzeniu, tj. zbadanie wielkości komórek za pomocą cytometrii przepływowej, morfologii jąder komórkowych, analizę cytoszkieletu komórkowego z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej oraz analizę ekspresji określonych cząsteczek (ligandów) na powierzchni komórek starzejących się (m.in. cząsteczki MIC-A, MIC-B, ULBP, HLA-ABC, PVR). Wyniki tych badań potwierdziły, że różne komórki nowotworowe charakteryzują się odmiennym fenotypem starzenia.

Pani mgr Kinga Godkowicz po zbadaniu indukcji procesu starzenia w badanych komórkach przystąpiła do zbadania interakcji komórek NK z komórkami docelowymi. Doktorantka wykazała aktywność cytotoksyczną komórek NK-92 względem nietraktowanych komórek raka pęcherza linii HCV29 oraz komórek indukowanych terapią. Słusznym podejściem w badaniach było pogłębienie analizy interakcji komórek NK-92 ze starzejącymi się komórkami linii HCV29. Doktorantka oceniła obecność formowania się synapsy immunologicznej (cytotoksycznej) pomiędzy komórkami NK, a komórkami raka pęcherza, wykazując że skuteczność tworzenia koniugatów pomiędzy komórką efektorową, a docelową jest na podobnym poziomie zarówno dla komórek nietraktowanych i komórek indukowanych terapią do starzenia się.

Analizując cytotoksyczność komórek NK względem nowotworowych komórek starzejących się linii HCV29 Doktorantka wykazała, że proces degranulacji komórek NK-92 jest na podobnym poziomie zarówno w przypadku komórek nowotworowych i komórek nowotworowych starzejących się. W efekcie proces starzenia komórki nowotworowej nie zwiększał aktywności cytotoksycznej komórek NK poprzez uwalnianie zawartości granul. Ciekawym podejściem w badaniach była również dokładna, multipleksowa analiza czynników SASP wydzielanych przez starzejące się komórki nowotworowe HCV29 oraz A549 i ich wpływ na komórki NK. Analiza profilu wydzielniczego wykazała wyraźny wzrost czynników charakterystycznych dla starzenia komórkowego, czyli cytokiny IL-8 oraz czynnika VEGF.

Doktorantka słusznie zauważa i podaje ograniczenia zastosowanego modelu komórkowego. Wybrana linia komórkowa NK-92 nie oddaje wszystkich właściwości komórek NK krwi obwodowej, ponadto wybrane nowotworowe linie komórkowe do indukcji starzenia nie pozwalają na dokładne

odzwierciedlenie mikrośrodowiska guza. Za cenną umiejętność mgr Kingi Godkowicz uważam zauważenie niedoskonałości modelu badawczego i uwzględnienie tego podczas analizy wyników.

Odpowiednio dobrany szeroki wachlarz technik, tj. hodowla *in vitro* różnych linii, izolacja i hodowla komórek z materiału klinicznego, testy kolorymetrycznych MTS, cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna, testy immunoenzymatyczne (ELISA), jak również wnikliwa analiza uzyskanych danych, prawidłowa ich interpretacja i poddanie dyskusji pozwala stwierdzić, że Doktorantka posiada bogaty warsztat metodyczny i odpowiednie przygotowanie do dalszej, samodzielnej pracy badawczej.

Wyniki przeprowadzonych badań były już prezentowane przez Doktorantkę na dwóch konferencjach naukowych w formie referatów ustnych.

4. Oryginalność rozprawy

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej p. mgr Kingi Godkowicz uzupełniają obecny stan wiedzy na temat interakcji komórek układu immunologicznego z komórkami ulegającymi starzeniu. Badania doktorantki wnoszą nowe dane na temat wpływu czynników wydzielanych przez komórki starzejące się na aktywność komórek NK. Bardzo ciekawym wynikiem uzyskanym przez Doktorantkę jest wykazanie efektu proapoptotycznego i immunosupresyjnego względem komórek NK, ale tylko w ustalonej linii komórkowej NK-92. Efekt ten nie był obserwowany w izolowanych komórkach PBMC i w wyodrębnionej populacji komórek NK CD56+. Na uwagę zasługuje również fakt, że dotychczas nie indukowano starzenia komórkowego w komórkach raka pęcherza linii HCV29, co jak sama Doktorantka podkreśla – jest nowością.

Podjęta tematyka badawcza obejmująca zagadnienia starzenia się komórkowego i immunologii jest niezwykle aktualna w kontekście opracowania skutecznych terapii przeciwnowotworowych. Ponadto, obecne badania wskazują, że połączenie terapii opartej na starzeniu się komórek z innymi terapiami, np. immunoterapią może zwiększyć skuteczność leczenia nowotworów.

5. Pytania i/lub uwagi krytyczne, na które Recenzent oczekuje odpowiedzi kandydata w czasie obrony:

- 1) Jednym z wyników uzyskanych przez Doktorantkę jest wykazanie, że starzejące się komórki raka płuca linii A549 nie są podatne na aktywność komórek NK (wykres 10b, str. 80). Jak Doktorantka tłumaczy różnice w aktywności komórek NK (linia NK-92) wobec nowotworowych komórek raka pęcherza (podatne) oraz raka płuca (niepodatne)?
- 2) Jak Doktorantka wyjaśni zróżnicowanie aktywności komórek NK względem komórek starzejących się linii HCV29? W eksperymentach badania dynamiki interakcji Doktoranta podaje, że tylko niektóre z komórek ulegają wydajnej eliminacji, w innych mimo kontaktu nie dochodzi do uruchomienia apoptozy w komórce docelowej. Czym może to być spowodowane?
- 3) Analizę aktywności cytotoksycznej względem komórek nowotworowych analizowano na podstawie mechanizmu degranulacji, wiążącego się z ekspresją cząsteczki CD107a na powierzchni kom. NK. Nie wykazano różnic, jeśli chodzi o degranulację. Czy rozpatrywano

zbadanie również innego markera tego procesu? oraz czy podjęto próby sprawdzenia innego mechanizmu cytotoksyczności komórek NK względem komórek docelowych, np. interakcje Fas-FasL ?

- 4) Starzejące się komórki nowotworowe mogą wykazywać osłabienie bądź utratę połączeń międzykomórkowych, co może sprzyjać migracji tych komórek. Ponadto nie wykazano zwiększonej aktywności komórek NK względem komórek starzejących się w porównaniu do komórek bez indukowanego procesu starzenia. Doktorantka wykazała również, że nie wszystkie testowane linie komórkowe charakteryzowały się zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G2/M, jak np. wykluczona do dalszych testów linia raka piersi MCF-7. Na jakie czynniki według Doktorantki należałoby zwrócić uwagę w badaniach chcąc dalej rozwijać ścieżkę terapii opartą na indukcji starzenia komórkowego?

6. Inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy rozprawy:

- moją uwagę zwrócił bardzo poprawny i staranny styl pracy. Pani mgr Kinga Godkiewicz wykazała się umiejętnością opisu trudnych zagadnień i uzyskanych wyników w sposób bardzo spójny, konsekwentny, przejrzysty i dostępny, skupiając się na aspektach niezbędnych do zrozumienia tematyki pracy. Pracę tę czytałam z ogromnym zainteresowaniem. Po odpowiedniej edycji sugeruję skierowanie pracy do publikacji w formie artykułu naukowego. Na uwagę zasługuje również opracowanie wyników w pracy. Przedstawione dane w odpowiednich podrozdziałach są bardzo czytelnie, dodatkowo na końcu każdego z podrozdziałów Doktoranta podaje ich krótkie podsumowanie. Kluczowe etapy badań również są odpowiednio podsumowane.

- ostrożna byłabym jednak przy formułowaniu tytułu podrozdziału 4.1.2. Zmiany morfologiczne i strukturalne w komórkach TIS. W mojej ocenie nie poddawano analizie struktury komórki czy organelli komórkowych. W tym wypadku bardziej właściwe byłoby użycie pojęcia morfologia czy zmiany w układzie cytoszkieletu.

7. Ocena końcowa:

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Godkiewicz 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 nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Uzasadnienie wniosku:

Mimo, że wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej p. Kingi Godkiewicz nie zostały jeszcze przedstawione w oryginalnym artykule naukowym oraz nie stanowią one przedmiotu wniosku patentowego uważam, że zakres i konsekwencja w prowadzonych badaniach, ich istotność i znaczenie dla rozwoju terapii przeciwnowotworowych opartych na mechanizmach działania układu immunologicznego upoważnia mnie do przedstawienia do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk wniosku o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Kingi Godkowicz stosowną nagrodą.

15.01.2026 r.
data sporządzenia recenzji


.....
podpis recenzenta