



Łódź 06-01-2025

## Recenzja

### rozprawy doktorskiej mgr Jagody Siemaszko

pt. „Zmienność genetyczna oraz ekspresja receptorów komórek NK należących do rodziny NKG2 i ich ligandów w przebiegu allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych”

Allogeniczne transplantacje macierzystych komórek krwiotwórczych (alloSCT) są uznana metodą leczenia nowotworowych i nienowotworowych chorób układu krwiotwórczego, a ich liczba zarówno w Polsce jak i na świecie stale wzrasta. Powikłania po alloHSCT można podzielić na immunologiczne i nieimmunologiczne. Do najczęstszych powikłań immunologicznych należy choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD), i dotyczy od 30% nawet do 70% chorych poddanych procedurze transplantacji. W zależności od okresu, w którym występuje GvHD oraz objawów klinicznych dzieli się tę chorobę na 2 główne postaci: ostrą (aGvHD) i przewlekłą (cGvHD). Natomiast do najczęstszych powikłań nieimmunologicznych należą infekcje: bakteryjne, wirusowe, grzybicze czy wywołane patogenami atypowymi.

W tym kontekście, temat badań podjęty przez mgr Jagodę Siemaszko jest niezmiernie ważny i aktualny.

Pracę doktorską mgr Jagody Siemaszko stanowi cykl 4 publikacji, w których jest pierwszym autorem, o łącznym IF 15.2, co świadczy o wysokich walorach naukowych przeprowadzonych badań. Przedłożona do oceny praca ma układ nietypowy dla rozpraw doktorskich. Liczy ogółem około 190 stron. Rozpoczyna się streszczeniem w języku polskim i angielskim, następnie dołączone są oświadczenia współautorów publikacji, a w dalszej kolejności przedstawione są 4 pełnotekstowe publikacje. W osobnym pliku dostępnym tylko w postaci elektronicznej jest autoreferat rozpoczynający się od spisu treści, tytułów publikacji tworzących rozprawę doktorską, następnie znajduje się wprowadzenie, cel pracy, schemat przebiegu badania, omówienie wyników i wnioski, notka biograficzna, dorobek naukowy oraz bibliografia.

Wstęp, cel pracy, wyniki wraz z ich omówieniem i wnioski powinny stanowić integralną część rozprawy doktorskiej, a nie autoreferatu. Przedstawienie pracy zaproponowane przez Doktorantkę na pewno utrudnia czytelnikowi odbiór.

We wstępie Autorka w rzetelny sposób przedstawiła aktualny stan wiedzy w zakresie wybranego przez siebie tematu. Tekst wstępu jest uzupełniony o 1 rycinę. Swobodny sposób poruszania się w obszarze tego trudnego zagadnienia dowodzi dojrzałości naukowej Autorki. Jednak Doktorantka nie ustrzegła się pojedynczych błędów edytorskich, stylistycznych czy zastosowania zwrotów z języka potocznego.

Celem pracy było zdefiniowanie roli determinant komórek NK w przebiegu rozwoju komplikacji u pacjentów poddanych allogenicznemu przeszczepieniu komórek krwiotwórczych.

Materiał i metody, wykorzystane testy statystyczne, wyniki przedstawione są jedynie w poszczególnych publikacjach.

Publikacja pierwsza:

Siemaszko J., Łacina P., Szymczak D., Szeremet A., Majcherek M., Czyż A., Sobczyk-Kruszelnicka M., Fidyk W., Solarska I., Nasiłowska-Adamska B., Skowrońska P., Bieniaszewska M., Tomaszewska A., Basak G.W., Giebel S., Wróbel T., Bogunia-Kubik K.

“Significance of HLA-E and its two NKG2 receptors in development of complications after allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells.” *Frontiers in Immunology*, 2023, 14, 1227897. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1227897> (IF=5.7)

Publikacja druga:

Siemaszko, J., Dratwa, M., Szeremet, A., Majcherek, M., Czyż, A., Sobczyk-Kruszelnicka, M., Fidyk, W., Solarska, I., Nasiłowska-Adamska, B., Skowrońska, P., Bieniaszewska, M., Tomaszewska, A., Basak, G. W., Giebel, S., Wróbel, T., & Bogunia-Kubik, K.

MICB Genetic Variants and Its Protein Soluble Level Are Associated with the Risk of Chronic GvHD and CMV Infection after Allogeneic HSCT. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2023, 72(1), 10.2478/aite-2024-0012. <https://doi.org/10.2478/aite-2024-0012> (IF=3.2)

Publikacja trzecia:

Siemaszko, J., Łacina, P., Szymczak, D., Szeremet, A., Majcherek, M., Czyż, A., Sobczyk-Kruszelnicka, M., Fidyk, W., Solarska, I., Nasiłowska-Adamska, B., Skowrońska, P., Bieniaszewska, M., Tomaszewska, A., Basak, G. W., Giebel, S., Wróbel, T., & Bogunia-Kubik, K.

Soluble MICA concentrations and genetic variability of MICA and its NKG2D receptor as factors affecting Graft-versus-Host Disease development after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Human Immunology 2024 - praca przyjęta do druku (IF=3.1)

Publikacja czwarta:

Siemaszko, J., Marzec-Przyszlak, A., & Bogunia-Kubik, K.

Activating NKG2C Receptor: Functional Characteristics and Current Strategies in Clinical Applications. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2023 71(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s00005-023-00674-z> (IF=3.2)

Omówienie wyników zostało podzielone na trzy podrozdziały, zgodnie z wcześniejszym planem prowadzenia badań:

1. Badania immunogenetyczne; określenie związku zmienności polimorficznej wybranych receptorów komórek NK z rodziny NKG2 oraz ich ligandów z ryzykiem rozwoju poprzyszczepowych powikłań
2. Poziom białek w surowicy; analiza poziomów rozpuszczalnych form ligandów w surowicy biorców dla wybranych receptorów komórek NK oraz ich zmian w czasie po przeszczepieniu
3. Ekspresja powierzchniowa receptorów na komórkach NK; badania z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, mające na celu analizę i porównanie różnic w ekspresji receptorów na powierzchni komórek NK w czterech punktach czasowych po przeszczepieniu.

Badania mgr Jagody Siemaszko obejmowały osiem polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, zlokalizowanych w obrębie genów kodujących receptory NKG2A (rs7301582), NKG2D (rs1049174,

rs1154831), a także ich ligandy HLA-E (rs1264457), MICA (rs1051792, rs1063635) oraz MICB (rs1065075, rs3828903). Ponadto analizowano obecność 16-kb nukleotydowej delecji w obrębie genu kodującego aktywujący receptor NKG2C. Do przeprowadzenia badań zmienności polimorficznej wybranych genów wykorzystano PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR) oraz PCR z użyciem swoistych sekwencji inicjujących (ang. Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers, PCR-SSP). Materiał do badania stanowiło DNA, wyizolowane z krwi pełnej biorców oraz dawców przeszczepienia.

Dokładne wyniki badań dotyczące wpływu wybranych polimorfizmów na rozwój powikłań potransplantacyjnych u pacjentów poddanych alloH SCT zostały przedstawione na łamach publikacji 1 i 2. Podsumowując wykazano, że niektóre warianty genetyczne mogą być powiązane z większym lub mniejszym ryzykiem komplikacji poprzyszczepowych. Ponadto allel C NKG2A rs7301582 wykryty został ze zwiększoną częstością w grupie biorców (a także w obrębie grupy biorców chorych na AML), co świadczyć może o jego negatywnej roli. Warty podkreślenia jest fakt, że obserwacja dotycząca obecności związku polimorfizmu NKG2A rs7301582 z ryzykiem wystąpienia chorób układu krwiotwórczego jest pierwszym takim spostrzeżeniem w piśmiennictwie.

Ponadto, badania mgr Jagody Siemaszko, obejmowały ocenę stężenia białek w surowicy, analizę poziomów rozpuszczalnych form ligandów w surowicy biorców dla wybranych receptorów komórek NK oraz ich zmian w czasie po alloH SCT. Ligandami dla receptorów komórek NK z rodziny NKG2 są cząsteczki HLA-E, MICA oraz MICB, należące do nieklasycznych cząsteczek MHC klasy I. Cząsteczki te mogą występować w dwóch formach; związanej z błoną komórkową oraz w formie rozpuszczalnej. Obecność rozpuszczalnych form ligandów w surowicy może prowadzić do osłabienia działania komórek NK, poprzez ich zdolność do oddziaływania z odpowiadającymi im receptorami. Blokują to zdolność wiązania receptorów z ligandami znajdującymi się na powierzchni komórek docelowych. Doktorantka oceniła stężenie rozpuszczalnych form ligandów wybranych receptorów komórek NK w surowicy biorców poddanych alloH SCT w + 30 i 9+ 0 dobie. Stężenia rozpuszczalnych form ligandów receptorów komórek NK zbadano za pomocą technik ELISA oraz Luminex. Wykazano, że w surowicy pobranej 30 dni po transplantacji poziom sHLA-E jest mniejszy u pacjentów, którzy rozwinęli zarówno ostrą, jak i przewlekłą postać GvHD. Wyższe stężenie rozpuszczalnej formy MICB w grupie pacjentów z cGvHD. Podwyższony poziom sMICB zaobserwowano także w grupie pacjentów, w której wystąpiła infekcja CMV.



Wykorzystując cytometrię przepływową Doktorantka oceniała ekspresję receptorów na komórkach NK w czterech punktach czasowych po alloHSCT. Wykazano korelacje pomiędzy wzrostem ekspresji receptorów, a infekcją CMV i cGVHD co, o świadczy o zaangażowaniu tych komórek w walkę z zakażeniem jak i ich aktywacją w przebiegu GvHD.

Pracę wieńczą cztery trafnie sformułowane wnioski na podstawie uzyskanych wyników.

Podsumowując, praca doktorska mgr Jagody Siemaszko stanowi wyczerpujące, samodzielne rozwiązanie problemu. Jednak z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć, że w swojej pracy Doktorantka nie uwzględniła dyskusji, która zawsze jest wartościową częścią rozprawy doktorskiej. Niemniej dyskusje Autorka prowadziła w ramach każdej publikacji wchodzących w skład cyklu publikacji do doktoratu. Dyskusje prowadzona na łamach czasopism świadczą o szerokiej wiedzy Autorki jak i umiejętności krytycznej analizy swoich wyników i piśmiennictwa. Publikacja 4, która zamyka cykl publikacji jest pracą poglądową, która w mojej ocenie powinna go otwierać wprowadzając czytelnika w temat.

### Ocena końcowa

Przedstawioną mi do recenzji pracę oceniam pozytywnie. Przygotowana została w sposób niestandardowy, ale w mojej ocenie przedstawiony cykl publikacji i wnioski z niego płynące są spójne. Doktorantka rozwiązała samodzielnie problem istotny z punktu widzenia naukowego i klinicznego, a badania prowadzone były zarówno za pomocą badań genetycznych, cytometrycznych i immunologicznych.

Rozprawa doktorska mgr Jagody Siemaszko spełnia ustawowe warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742, z późn. zm.) dla pracy na stopień naukowy doktora nauk medycznych.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pozytywną recenzję pracy i wnoszę o dopuszczenie mgr Jagody Siemaszko do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Prof. UM  
Dr hab. n. med. *Jana* Pluta  
Hematolog  
Specjalista chorób wewnętrznych  
6394192