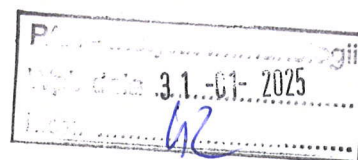


Prof. dr hab. med. Iwona Hus

Klinika Hematologii

Państwowy Instytut Medyczny MSWiA



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”
przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Bogunia-Kubik

Allogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych (*allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT*) jest uznaną metodą leczenia chorych na nowotwory układu krwiotwórczego i chłonnego, przy czym do najczęstszych wskazań do tej procedury stanowią ostre białaczki oraz nowotwory mielodysplastyczne (MDS). Allo-HSCT jest w wielu przypadkach jedyną szansą dla chorego na uzyskanie wyleczenia, niesie jednak ze sobą ryzyko ciężkich, zagrażających życiu powikłań zależnych od procedury, do których należą: uszkodzenie tkanek i narządów związane z kondycjonowaniem, zakażenia (m. in. wirusem cytomegalii, CMV) wynikające z głębokich niedoborów odporności oraz choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (*graft-versus-Host Disease, GvHD*). Nasilenie powikłań związane jest z rodzajem choroby podstawowej, wiekiem, stanem ogólnym i chorobami współistniejącymi pacjenta, rodzajem schematu kondycjonowania (w przypadku chorób rozrostowych), profilaktyki GVHD, a także wiekiem i płcią dawcy, zgodnością w zakresie HLA i źródłem komórek krwiotwórczych. (szpik, krew obwodowa krew pępowinowa). Najczęściej wykorzystywanym źródłem komórek krwiotwórczych jest krew obwodowa. Według danych Europejskiej Grupy do spraw Przeszczepienia Krwi i Szpiku (*European Group for Blood and Marrow Transplantation, EBMT*) z roku 2024 krew obwodowa stanowiła źródło komórek krwiotwórczych w 70-90% wszystkich procedur transplantacji. Rekonstrukcja układu odporności jest kluczowa dla powodzenia allo-SCT, a komórki NK, które stanowiły przedmiot badań Doktorantki są odtwarzane jako jedne z pierwszych populacji po

HSCT i wykazują najwyższą aktywność cytotoksyczną we wczesnym okresie potransplantacyjnym. Komórki NK zmniejszają ryzyko choroby GvHD, zwiększając przy tym efekt GVT. Rozpoznawanie i eliminowanie komórek nowotworowych przez komórki NK jest w dużym stopniu regulowane poprzez szereg receptorów aktywujących lub hamujących ich efektorową funkcję. Receptory na komórkach NK: KIR (*killer cell inhibitory receptors*), Ly49 i CD94/NKG2A są zaangażowane w rozpoznawanie polimorficznych MHC klasy I i wykrywają utratę ekspresji cząsteczek HLA klasy I lub innych specyficznych sygnałów komórkowych niezależnych od MHC klasy I. Kombinacja tych sygnałów wyzwała i moduluje funkcje efektorowe komórek NK. Cel pracy Doktorantki, którym było określenie roli determinant komórek NK w przebiegu powikłań po allo-HSCT jest w mojej opinii niezwykle ważny i aktualny.

Rozprawa doktorska mgr Jagody Siemaszko obejmuje cztery publikacje, w tym trzy prace oryginalne i jedną przeglądową:

1. 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. (2023). Significance of HLA-E and its two NKG2 receptors in development of complications after allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells. *Frontiers in Immunology*, 14, 1227897. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1227897> (IF= 5.7, 140 pkt. MNiSW).
2. 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. (2024). 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*, 72(1), 10.2478/aite-2024-0012. <https://doi.org/10.2478/aite-2024-0012> (IF= 3.2, 140 pkt. MNiSW).
3. 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. (2024). 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*, Nov;85(6):111147. doi: 10.1016/j.humimm.2024.111147. (IF= 3.1, 70 pkt. MNiSW).

4. Siemaszko, J., Marzec-Przyszlak, A., & Bogunia-Kubik, K. (2023). Activating NKG2C Receptor: Functional Characteristics and Current Strategies in Clinical Applications. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 71(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s00005-023-00674-z> (IF = 3.2, 140 pkt. MNiSW).

Wszystkie prace oryginalne powstały w ramach współpracy z pięcioma polskimi ośrodkami przeszczepowymi, z których pochodził materiał kliniczny: krew pełna lub surowica, w przypadku dawców pobrana przed HSCT a w przypadku biorców w czterech punktach czasowych. Grupa badana obejmowała 293 biorców i 128 dawców – było to możliwe dzięki dobrze zaplanowanym badaniom wieloośrodkowym. W pracy wykorzystano następujące metody badawcze: badania immunogenetyczne (metodą RT-PCR i PCR-SSP), badania ekspresji rozpuszczalnych form ligandów dla wybranych receptorów komórek NK na poziomie białka (Luminex, ELISA) oraz ekspresji receptorów powierzchniowych oraz fenotypu komórek NK metodą cytometrii przepływowej. Część eksperymentalna badań wykonana była w Laboratorium Immunogenetyki Klinicznej i Farmakogenetyki Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (PCR i ELISA) oraz w Katedrze i Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (cytometria przepływowa). Zastosowana metodyka jest nowoczesna i adekwatna do realizacji zamierzonego celu badawczego. Badania zostały przeprowadzone w ramach wieloośrodkowego projektu „Epigenomiczne, immunogenetyczne i proteomiczne strategie identyfikacji determinant komórek NK o prognostycznym znaczeniu u pacjentów poddanych alogenicznemu przeszczepieniu komórek krwiotwórczych” o numerze 2018/31/B/NZ2/03065 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Kierownikiem projektu była prof. dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik.

Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z IF (3,1 – 5,7) i we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem.

W pierwszej pracy oryginalnej Doktorantka wykazała istotne różnice między pacjentami i dawcami pod względem wariantów genetycznych NKG2A rs7301582 – u biorców częściej stwierdzono allel C niż u ich dawców (0,975 vs 0,865, $p < 0,0001$). Zwiększone stężenie rozpuszczalnego HLA-E (sHLA-E) w surowicy biorców 30 dni po przeszczepieniu wydaje się mieć nie tylko znaczenie prognostyczne, ale również odgrywać rolę ochronną. U biorców z wyższym stężeniem sHLA-E rzadziej występowała przewlekła GvHD lub ostra GvHD stopnia II-IV. Wykazano również niekorzystną rolę niezgodności genetycznej dawcy-biorcy w zakresie HLA-E w rozwoju zakażenia CMV po przeszczepieniu. Odsetki komórek NK NKG2C (zarówno CD56dim, jak i CD56bright) były wyższe u biorców, u których rozwinęło się zakażenie CMV, zwłaszcza 30 i 90 dni po przeszczepieniu. Wyniki badania potwierdziły znaczenie komórek NK w rozwoju powikłań po przeszczepieniu i wykazały wpływ wariantów genetycznych HLA-E i NKG2C, stężenia sHLA-E w surowicy, a także ekspresji powierzchniowej NKG2C na wyniki transplantacji.

W badaniach przedstawionych w drugiej publikacji przeprowadzono genotypowanie biorców HSCT i ich dawców pod kątem dwóch polimorfizmów MICB (rs1065075, rs3828903). Dodatkowo, ekspresję rozpuszczalnej formy MICB określono w próbkach surowicy biorców po przeszczepieniu przy użyciu testu Luminex. Wyniki badań wykazały korzystną rolę allelu G MICB rs1065075 w odniesieniu do wyników allo-HSCT. Biorcy, których dawcy byli nosicielami tego wariantu genetycznego, byli mniej podatni na rozwój cGvHD. Co więcej, obecność allelu G MICB rs1065075 zarówno w przypadku dawcy, jak i biorcy korelowała z niższą częstością reaktywacji zakażenia CMV). Wariant G MICB rs1065075 korelował z niższym stężeniem rozpuszczalnego MICB w surowicy (sMICB), stężenie sMICB w surowicy było wyższe u biorców z zakażeniem CMV w porównaniu do biorców bez infekcji. Ochronną rolę allelu G obserwowano również w przypadku polimorfizmu rs3828903, ponieważ był on częściej wykrywany u dawców biorców bez cGvHD. Ważnym wnioskiem tej pracy jest stwierdzenie, że warianty genetyczne MICB, a także stężenie sMICB w surowicy mogą

służyć jako czynniki prognostyczne ryzyka rozwoju cGvHD i zakażenia CMV po allo-HSCT.

W trzeciej pracy cyklu Doktorantka wykazała częstsze występowanie allelu NKG2D rs1049174 C u biorców z ostrą GvHD stopnia II-IV niż u osób z grupy kontrolnej lub chorych bez/łagodną GVHD oraz większy odsetek komórki NK z ekspresją NKG2D u chorych z przewlekłą GvHD. Nie obserwowano bezpośredniego związku między SNP MICA a GvHD, ale obecność genotypu MICA rs1051792 GG korelowała z wyższym stężeniem sMICA, a wyższe stężenie sMICA w surowicy wiązało się z wyższym ryzykiem przewlekłej GvHD. Przedstawione wyniki sugerują potencjalne wykorzystanie stężenie sMICA jako biomarkera przewlekłej GvHD i podkreślają wpływ zmienności genetycznej NKG2D i ekspresji powierzchniowej na wyniki HSCT.

W zamykającej cykl pracy przeglądowej Autorzy podsumowują wyniki badań nad klinicznym znaczeniem receptora NKG2C na komórkach NK NKG2C jest jednym z najlepiej poznanych receptorów komórek NK - w pracy opisano szeroko jego funkcję, cechy molekularne, interakcje z cząsteczką HLA-E Omówiono znaczenie NKG2C w infekcjach wirusowych (CMV, HIV, WZW B i C, COVID-19), chorobach autoimmunologicznych (łuszczyca, RZS, celiakia), w powikłaniach ciąży, jak również w odniesieniu do wyników transplantacji narządów litych i komórek krwiotwórczych. Przedstawiono również obecne i potencjalne strategie terapeutyczne – całość pracy wskazuje na dogłębną znajomość zagadnień, które stanowiły przedmiot rozprawy doktorskiej

Zakończenie rozprawy stanowią cztery wnioski, wynikające bezpośrednio z przeprowadzonych badań, które stanowią próbę odpowiedzi na pytania zawarte w celu pracy, podsumowanie przeprowadzonych analiz i wytyczenia kierunku dalszych badań.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Jagody Siemaszko pt. „Zmienność genetyczna oraz ekspresja receptorów komórek NK należących do rodziny NKG2 i ich ligandów w przebiegu allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 -4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym nauce* (t.j. Dz. U. 2023 poz. 742 z późn. Zm.). We wszystkich czterech publikacjach mgr Jagoda Siemaszko jest pierwszym

autorem i wszystkie zostały opublikowane w czasopiśmie z IF. Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej przyniosły cenne obserwacje, istotne dla poznania mechanizmów immunologicznych wpływających na przebieg i rozwój powikłań po allo-HSCT. Wyniki analiz wytyczają kierunki dalszych badań nad potencjalnymi biomarkerami prognostycznymi i predykcyjnymi rozwoju powikłań po allo-HSCT. Doktorantka wykazała się zarówno wiedzą teoretyczną jak również umiejętnością przeprowadzenia prac badawczych i wnikliwej analizy ich wyników. Z uwagi na powyższe mam zaszczyt i przyjemność przedłożyć Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Jagody Siemaszko do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Z uwagi na wysoką wartość naukową publikacji wchodzących w skład rozprawy wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Warszawa 12.01.2025

Jacek Uly