

**Katedra i Klinika Hematoonkologii i
Transplantacji Szpiku w Lublinie**

USK 1
ul. Staszica 11
20-081
tel. (81) 534 54 68
Kierownik Kliniki
Prof. dr hab. n. med. Marek Hus



PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 25.11.2024
L.dz. 438 Department of Hematology
and Bone Marrow
Transplantation

USK 1
Staszica 11
20-081
tel. (81) 534 54 68
Head of Department:
Professor Marek Hus, M.D., Ph.D.

Lublin, dn. 21.11.2024 r.

Recenzja

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Jagody Siemaszko
pt. „Zmienność genetyczna oraz ekspresja receptorów komórek NK z rodziny NKG2 i ich
ligandów w przebiegu allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych”
wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Katarzyny Boguni-Kubik
w Laboratorium Immunogenetyki Klinicznej i Farmakogenetyki Instytutu Immunologii i
Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Rozprawa doktorska mgr Jagody Siemaszko pt. „Zmienność genetyczna oraz ekspresja receptorów komórek NK z rodziny NKG2 i ich ligandów w przebiegu allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych” stanowi kompleksowe i innowacyjne opracowanie, które łączy zaawansowane analizy genetyczne, immunologiczne i kliniczne w kontekście jednego z najważniejszych procesów terapeutycznych w hematologii – allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych (HSCT). Autorka skupia się na kluczowej roli receptorów komórek NK (Natural Killer) z rodziny NKG2 oraz ich ligandów w regulacji odpowiedzi immunologicznej po przeszczepie, z naciskiem na ich potencjalne znaczenie prognostyczne i biomarkerowe w kontekście komplikacji poprzyszczepowych.

Przedmiot badań poruszony w pracy doktorskiej jest niezwykle aktualny i istotny z punktu widzenia współczesnej hematologii oraz immunologii klinicznej. Mgr Siemaszko analizuje mechanizmy molekularne i genetyczne, które mogą determinować ryzyko wystąpienia powikłań takich jak choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) czy infekcje wirusem cytomegalii (CMV). Badania te wpisują się w najnowsze trendy medycyny personalizowanej, umożliwiając lepsze zrozumienie indywidualnych różnic w odpowiedzi pacjentów na terapię.

Rozprawa składa się z cyklu czterech publikacji naukowych, z czego trzy są pracami oryginalnymi, a jedna ma charakter przeglądowy. Prace te zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, co świadczy o wysokiej jakości naukowej przedstawionych badań oraz ich uznaniu w środowisku akademickim. Ważnym aspektem jest także interdyscyplinarny charakter pracy, który łączy genetykę, immunologię oraz kliniczną hematologię, co czyni ją unikalną na tle innych rozpraw doktorskich.

Na szczególną uwagę zasługuje staranność metodologiczna i analityczna Autorki, która uwzględniła różnorodne techniki badawcze, w tym genotypowanie, oznaczanie poziomu

rozpuszczalnych form ligandów receptorów NK w surowicy oraz cytometrię przepływową. Wyniki badań zostały przedstawione w sposób spójny, logiczny i zrozumiały, co ułatwia ich interpretację i potencjalne wykorzystanie w praktyce klinicznej.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat procesów immunologicznych zachodzących po HSCT, a także otwiera nowe możliwości diagnostyczne i prognostyczne w kontekście terapii hematologicznych.

Publikacja nr 1

Pierwsza publikacja mgr Jagody Siemaszko, zatytułowana „*Significance of HLA-E and its two NKG2 receptors in development of complications after allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells*”, koncentruje się na roli receptorów komórek NK, NKG2A i NKG2C, oraz ich wspólnego liganda HLA-E w powstawaniu powikłań przeszczepowych, takich jak choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) oraz infekcje wirusem cytomegalii (CMV). Badanie obejmowało zarówno genetyczną analizę zmienności tych receptorów, jak i ocenę ich ekspresji oraz poziomu rozpuszczalnych ligandów w surowicy pacjentów. Wyniki badania wnoszą istotny wkład w zrozumienie mechanizmów molekularnych, które mogą wpływać na skuteczność terapii i ryzyko powikłań.

Badania genetyczne przeprowadzone przez autorkę wskazały na istotne różnice w częstości występowania alleli między biorcami a dawcami przeszczepów. Obecność allelu rs7301582 C w genie NKG2A była częstsza w grupie biorców, co sugeruje, że może on mieć znaczenie w regulacji odpowiedzi immunologicznej i być potencjalnym czynnikiem predykcyjnym ciężkich postaci ostrej GvHD. Z kolei delecja w genie kodującym receptor NKG2C była związana z wyższym ryzykiem rozwinięcia bardziej nasilonych postaci ostrej choroby GvHD. Wyniki te potwierdzają, że zmienność genetyczna w obrębie receptorów komórek NK może znacząco wpływać na przebieg odpowiedzi immunologicznej po transplantacji.

Autorka szczegółowo zbadała także wpływ zgodności alleli HLA-E między dawcą a biorcą. Niekompatybilność w tym zakresie wiązała się z podwyższonym ryzykiem przewlekłej choroby GvHD oraz infekcji CMV, ale nie była powiązana z rozwojem ostrej choroby GvHD. Wynik ten podkreśla znaczenie nieklasycznych cząsteczek HLA w patogenezie powikłań przeszczepowych i sugeruje, że uwzględnienie takich parametrów może w przyszłości poprawić proces kwalifikacji dawców i biorców.

Szczególnie interesującym aspektem pracy była analiza poziomu rozpuszczalnej formy HLA-E (sHLA-E) w surowicy pacjentów. Badania wykazały, że wyższy poziom sHLA-E korelował z mniejszym ryzykiem wystąpienia przewlekłej GvHD oraz ciężkich postaci ostrej GvHD. Co więcej, poziom sHLA-E zmieniał się w czasie po przeszczepie, co może sugerować jego dynamiczną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej i potencjalną wartość jako biomarkera prognostycznego. Wyniki te mają istotne znaczenie kliniczne, ponieważ wskazują na możliwość monitorowania pacjentów w oparciu o poziomy sHLA-E w celu wczesnego wykrywania ryzyka komplikacji.

W aspekcie metodologicznym publikacja wyróżnia się wysoką jakością zastosowanych technik badawczych. Genotypowanie pozwoliło na precyzyjną identyfikację polimorfizmów,

a wykorzystanie cytometrii przepływowej do analizy ekspresji receptorów na komórkach NK dostarczyło szczegółowych danych immunofenotypowych. Pomiar poziomów sHLA-E za pomocą technik ELISA został przeprowadzony z dużą dokładnością, co zwiększa wiarygodność uzyskanych wyników. Statystyczna analiza danych została przeprowadzona rzetelnie, co potwierdza klarowne wnioski przedstawione w publikacji.

Opublikowanie artykułu w renomowanym czasopiśmie *Frontiers in Immunology* świadczy o wysokim poziomie naukowym przedstawionych badań oraz ich znaczeniu dla środowiska naukowego. Praca ta wnosi istotny wkład w zrozumienie mechanizmów immunologicznych powikłań przeszczepowych, a jednocześnie otwiera nowe możliwości zastosowań klinicznych. Mgr Siemaszko odegrała kluczową rolę w projektowaniu badań, ich realizacji oraz przygotowaniu publikacji, co dowodzi jej samodzielności i dojrzałości naukowej.

Publikacja nr 2

Druga publikacja mgr Jagody Siemaszko, zatytułowana „*MICB Genetic Variants and Its Protein Soluble Level Are Associated with the Risk of Chronic GvHD and CMV Infection after Allogeneic HSCT*”, stanowi pogłębione badanie nad rolą genetycznej zmienności cząsteczki MICB, jednego z ligandów receptora NKG2D, w rozwoju przewlekłej choroby GvHD oraz infekcji wirusem cytomegalii (CMV) po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Badania te są wyjątkowe pod względem kompleksowości, obejmując zarówno analizę genotypową, jak i ocenę poziomu rozpuszczalnej formy MICB (sMICB) w surowicy pacjentów. Ich celem było lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych powikłań przeszczepowych oraz identyfikacja potencjalnych biomarkerów prognostycznych.

Wyniki badań genetycznych przeprowadzonych przez autorkę wykazały, że określone warianty MICB są istotnie związane z ryzykiem wystąpienia przewlekłej GvHD oraz infekcji CMV. Allel G polimorfizmu rs1065075 występował rzadziej zarówno u dawców, jak i biorców przeszczepów, którzy rozwinęli przewlekłą GvHD. Co istotne, ta sama zależność była obserwowana w przypadku infekcji CMV, co sugeruje ochronną rolę tego wariantu genetycznego. Wyniki te wskazują, że analiza genotypu MICB może mieć praktyczne zastosowanie w ocenie ryzyka powikłań przeszczepowych.

Badania nad poziomem sMICB w surowicy pacjentów dostarczyły równie interesujących wyników. Pacjenci z wyższymi poziomami sMICB byli bardziej narażeni na rozwój przewlekłej choroby GvHD oraz infekcji CMV. Dodatkowo, autorka zaobserwowała, że poziom sMICB jest skorelowany z genotypem pacjenta – homozygotyczny genotyp AA zarówno w polimorfizmie rs1065075, jak i rs3828903 wiązał się z wyższymi stężeniami sMICB w surowicy. Te dane sugerują, że poziom sMICB może stanowić cenny biomarker do monitorowania ryzyka powikłań przeszczepowych.

Pod względem metodologicznym publikacja wyróżnia się zastosowaniem zaawansowanych technik analitycznych. Genotypowanie zostało przeprowadzone z wykorzystaniem nowoczesnych metod SNP, co zapewniło wysoką precyzję wyników. Dodatkowo, poziom

sMICB w surowicy był mierzony przy użyciu testów immunoenzymatycznych (ELISA), co pozwoliło na dokładne porównanie grup pacjentów i identyfikację istotnych zależności. Zastosowanie analizy wieloczynnikowej, uwzględniającej takie zmienne jak wiek pacjenta, obecność przeciwciał anty-CMV oraz inne czynniki kliniczne, podniosło wartość naukową badań, umożliwiając bardziej precyzyjną interpretację wyników.

Wyniki przedstawione w tej publikacji mają istotne znaczenie zarówno dla nauki, jak i praktyki klinicznej. Identyfikacja wariantów genetycznych MICB oraz ich powiązań z powikłaniami przeszczepowymi otwiera nowe możliwości w zakresie personalizacji terapii. Dodatkowo, zidentyfikowanie wysokiego poziomu sMICB jako czynnika ryzyka może znaleźć zastosowanie w rutynowej ocenie pacjentów po transplantacji. Wyniki te są szczególnie istotne w kontekście rosnącego znaczenia medycyny precyzyjnej, która wymaga uwzględniania indywidualnych różnic genetycznych i biochemicznych.

Mgr Jagoda Siemaszko odegrała kluczową rolę w realizacji tego projektu, od planowania badań i przeprowadzania analiz, po przygotowanie manuskryptu. Złożoność badań oraz znaczenie wyników podkreślają jej zaawansowane kompetencje naukowe. Publikacja w prestiżowym czasopiśmie *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* dodatkowo potwierdza wartość naukową tego opracowania.

Publikacja nr 3

Trzecia publikacja mgr Jagody Siemaszko, zatytułowana „*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*”, dotyczy genetycznej zmienności cząsteczki MICA oraz jej wpływu na ryzyko wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) w kontekście ekspresji receptora NKG2D na komórkach NK. Praca ta koncentruje się także na poziomie rozpuszczalnej formy MICA (sMICA) w surowicy pacjentów po przeszczepieniu oraz na jego potencjalnym znaczeniu prognostycznym.

W badaniach genetycznych autorka zidentyfikowała istotne korelacje między obecnością specyficznych alleli MICA a ryzykiem wystąpienia GvHD. Pacjenci, u których występował allel rs1065075 G (zarówno w genotypach heterozygotycznych AG, jak i homozygotycznych GG), charakteryzowali się podwyższonym stężeniem sMICA w surowicy. Co więcej, pacjenci, których dawcy posiadali allel G, również wykazywali wyższe poziomy sMICA, co wskazuje na wpływ genotypu dawcy na powikłania przeszczepowe. Wyniki te stanowią interesujący wkład do wiedzy na temat genetycznej zmienności MICA jako potencjalnego czynnika ryzyka.

Analiza poziomów sMICA w surowicy wykazała istotne zmiany w czasie po przeszczepie. Wzrost stężenia sMICA odnotowano zarówno u pacjentów, u których rozwinęto ostrą, jak i przewlekłą postać choroby GvHD, przy czym wyższe stężenia obserwowano w dniu +30 i +90 po przeszczepieniu. Co istotne, odsetek komórek NK NKG2D+ różnił się w zależności od poziomu sMICA – niższe stężenia sMICA były związane z większą populacją NKG2D+ NK w

dniu +30, co wskazuje na potencjalną interakcję między ligandem a receptorem w kontekście odpowiedzi immunologicznej.

Pod względem metodologicznym badanie wyróżnia się kompleksowym podejściem. Genotypowanie MICA zostało przeprowadzone z użyciem precyzyjnych narzędzi analitycznych, co zapewniło wysoką dokładność w określaniu zmienności genetycznej. Analiza cytometryczna receptorów NKG2D na komórkach NK pozwoliła na szczegółowe zbadanie fenotypu immunologicznego pacjentów w różnych punktach czasowych. Z kolei pomiary poziomów sMICA w surowicy za pomocą ELISA umożliwiły identyfikację istotnych zależności między biochemią a wynikami klinicznymi.

Znaczenie wyników tej publikacji jest wielowymiarowe. Po pierwsze, identyfikacja genetycznych wariantów MICA jako czynników ryzyka dostarcza nowych możliwości diagnostycznych i prognostycznych w transplantologii hematologicznej. Po drugie, zmieniający się poziom sMICA może stanowić dynamiczny biomarker monitorowania pacjentów po przeszczepie, co może mieć praktyczne zastosowanie w ocenie ryzyka powikłań. Wreszcie, wyniki wskazujące na zależność między sMICA a odsetkiem komórek NKG2D+ NK sugerują, że interakcja między ligandami i receptorami komórek NK odgrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej.

Publikacja ta potwierdza zaawansowane umiejętności naukowe mgr Siemaszko, zarówno w zakresie projektowania badań, jak i analizy wyników. Jej wkład w realizację badań oraz przygotowanie manuskryptu był kluczowy, co znajduje potwierdzenie w oświadczeniach współautorów. Praca została przyjęta do druku w prestiżowym czasopiśmie *Human Immunology*, co dodatkowo podkreśla jej wartość i uznanie w środowisku naukowym.

Publikacja nr 4

Czwarta publikacja, zatytułowana „*Activating NKG2C Receptor: Functional Characteristics and Current Strategies in Clinical Applications*” i opublikowana w *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, ma charakter przeglądowy i stanowi podsumowanie aktualnej wiedzy na temat aktywującego receptora NKG2C oraz jego roli w procesach immunologicznych i potencjalnych zastosowaniach klinicznych. Praca ta w wyjątkowy sposób ogniskuje wyniki przedstawione w poprzednich publikacjach, umiejscawiając je w szerszym kontekście naukowym.

Autorka w sposób klarowny przedstawiła funkcje receptora NKG2C oraz jego interakcje z ligandem HLA-E, który odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności komórek NK. Szczególny nacisk położono na biologiczne i kliniczne znaczenie tych interakcji, zwłaszcza w kontekście transplantologii i terapii przeciwnowotworowej. Przegląd literatury objął także obecny stan wiedzy na temat polimorfizmów genetycznych wpływających na ekspresję NKG2C oraz ich potencjalne implikacje kliniczne.

W pracy tej autorka nie tylko wykazała doskonałą znajomość literatury przedmiotu, ale także umiejętność krytycznego myślenia i syntetyzowania informacji z różnych źródeł. Wnioski

płynące z przeglądu wskazują na potrzebę dalszych badań nad zastosowaniami klinicznymi NKG2C, szczególnie w kontekście personalizacji terapii i poprawy wyników leczenia pacjentów po HSCT.

Publikacja ta uzupełnia cykl rozprawy doktorskiej mgr Siemaszko, podkreślając jej wszechstronność badawczą i zdolność do poruszania się zarówno w obszarze badań empirycznych, jak i analizy literatury naukowej. Znaczenie tej pracy przejawia się w jej potencjale edukacyjnym oraz w możliwości inspirowania przyszłych badań.

Podsumowując:

Rozprawa doktorska mgr Jagody Siemaszko pt. *„Zmienność genetyczna oraz ekspresja receptorów komórek NK z rodziny NKG2 i ich ligandów w przebiegu allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych”* stanowi kompleksowe i niezwykle wartościowe opracowanie naukowe, które w innowacyjny sposób łączy analizy genetyczne, immunologiczne i kliniczne. Przedstawione wyniki badań w czterech publikacjach wnoszą istotny wkład w zrozumienie mechanizmów molekularnych powikłań poprzyszczepowych oraz ich potencjalne zastosowania diagnostyczne i prognostyczne. Badania te są szczególnie ważne w kontekście dynamicznego rozwoju transplantologii hematologicznej oraz rosnącej roli medycyny personalizowanej.

Każda z publikacji składających się na rozprawę ma swój unikalny wkład w rozwój wiedzy naukowej. Pierwsze trzy prace, oparte na badaniach oryginalnych, w sposób systematyczny analizują rolę receptorów NKG2A, NKG2C i NKG2D oraz ich ligandów (HLA-E, MICB i MICA) w powikłaniach takich jak choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) i infekcje wirusem CMV. Publikacje te dostarczają nie tylko nowych danych o znaczeniu klinicznym, ale także otwierają możliwości dla dalszych badań i zastosowań biomarkerów w praktyce klinicznej. Czwarta praca, będąca przeglądem literatury, doskonale uzupełnia cykl publikacji, zapewniając kontekst teoretyczny oraz podsumowując stan wiedzy na temat receptorów NK. Metodologiczna rzetelność i zaawansowanie badań zasługują na szczególne podkreślenie. Autorka wykorzystwała szeroką gamę zaawansowanych technik badawczych, takich jak genotypowanie SNP, pomiar poziomów rozpuszczalnych ligandów za pomocą ELISA, analiza cytometryczna ekspresji receptorów na komórkach NK oraz wieloczynnikowa analiza statystyczna. Każdy z tych elementów został precyzyjnie zaplanowany i zrealizowany, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz jej umiejętności samodzielnego prowadzenia badań. Istotnym elementem pracy jest jej interdyscyplinarny charakter. Rozprawa łączy w sobie elementy genetyki, immunologii i hematologii klinicznej, co czyni ją szczególnie wartościową w kontekście praktycznych zastosowań wyników. Wyniki dotyczące zmienności genetycznej oraz poziomów rozpuszczalnych ligandów mogą znaleźć zastosowanie w lepszym doborze dawców i biorców przeszczepów oraz w monitorowaniu pacjentów po przeszczepieniu. Identyfikacja biomarkerów prognostycznych takich jak sHLA-E, sMICB i sMICA otwiera nowe możliwości w personalizacji terapii i zapobieganiu powikłaniom poprzyszczepowym.

Publikacje mgr Siemaszko zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o wysokim prestiżu, co potwierdza ich wartość i znaczenie dla środowiska naukowego. Wysoka jakość badań, przejrzystość wyników oraz ich interpretacja są dowodami na wysoki poziom naukowy autorki. Ponadto, oświadczenia współautorów jasno wskazują, że mgr Siemaszko odegrała kluczową rolę we wszystkich etapach realizacji badań, co podkreśla jej samodzielność i zaangażowanie.

Konkludując, rozprawa mgr Jagody Siemaszko wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy o molekularnych mechanizmach powikłań przeszczepowych i stanowi doskonały przykład pracy doktorskiej opartej na cyklu publikacji. Wyniki badań mają potencjał do dalszych aplikacji klinicznych, co czyni tę pracę szczególnie wartościową dla środowiska medycznego. Autorka wykazała się wszechstronnością, zaawansowanymi umiejętnościami badawczymi i zdolnością do krytycznego myślenia, co jednoznacznie wskazuje na jej dojrzałość naukową.

Przedstawiona rozprawa doktorska **spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. DZ.U.2023 poz.742 z późn. zm.)** Praca mgr Jagody Siemaszko ma charakter poznawczy i niesie ze sobą potencjalne implikacje praktyczne, szczególnie w kontekście medycyny personalizowanej oraz transplantologii hematologicznej.

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Jagody Siemaszko do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie biorąc pod uwagę:

1. Wartość merytoryczną pracy
2. Nowoczesną metodykę badań
3. Ogromny wkład pracy włożony w zebranie wszystkich danych i staranne opracowanie rozprawy oraz umiejętność rozwiązywania trudnych problemów naukowych i przeprowadzenia krytycznej dyskusji własnych wyników badań w odniesieniu do piśmiennictwa.

Zgłaszam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. n. med. Marek Hus

**KATEDRA KLINIKI HEMATOONKOLOGII
I TRANSPLANTACJI SZPIKU
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-081 Lublin, ul. Świszka 11
tel.: (081) 534-01-04, fax: (081) 534-71-06**

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Hematoonkologii
i Transplantacji Szpiku
Prof. dr hab. n. med. Marek Hus