

dr hab. n. med. i n. o zdr. Krzysztof Czyżewski, prof. UMK  
Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii  
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
85-094 Bydgoszcz, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9  
Tel 52-585-48-60, Fax. 52-585-47-56  
e-mail: k.czyzewski@cm.umk.pl



Bydgoszcz, 28 marca 2022 roku

## Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. Elżbiety Róży Wawrzyniak-Dzierżek

pt. „*Wpływ immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR) u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku na wyniki leczenia i chimeryzm*”

Uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 425/II/2022 z dnia 17 lutego 2022 r. zostałem powołany na recenzenta rozprawy doktorskiej lekarz Elżbiety Róży Wawrzyniak-Dzierżek zatytułowanej „*Wpływ immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR) u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku na wyniki leczenia i chimeryzm*”. Praca została przygotowana pod opieką naukową Promotora Prof. dr. hab. Marka Ussowicza w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

### 1. Ocena merytoryczna

#### **Trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność**

Transplantacja allogenicznych komórek krwiotwórczych jest uznaną metodą leczenia wielu chorób nowotworowych oraz nienowotworowych. Krytycznym punktem decyzyjnym jest wybór odpowiedniego dawcy dla biorcy komórek krwiotwórczych. W przypadku braku zgodnego w zakresie HLA (HLA, *human leukocyte antigens*) dawcy rodzinnego, optymalnym dawcą komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej lub ze szpiku kostnego jest zgodny w HLA dawca niespokrewniony. Najlepiej by taki dawca charakteryzował się pełną zgodnością wszystkich alleli kodujących antygeny HLA-A, -B, -C, -DR oraz -DQ (tzn. zgodny w 10 na 10 badanych alleli HLA). Ponadto kluczową rolę w wyborze potencjalnego dawcy odgrywają: pokrewieństwo z biorcą (odpowiada za wielkość wspólnej puli genów), wiek, status serologiczny w zakresie przebycia infekcji CMV, niezgodność płci dawca/biorca a także zgodność w zakresie mniejszych antygenów zgodności tankowej. Dla pacjentów nie posiadających w pełni zgodnych dawców opcją terapeutyczną jest transplantacja od dawcy częściowo zgodnego lub haploidentycznego. W ostatnich latach, w transplantologii komórek krwiotwórczych

co raz częściej podkreślane jest znaczenie immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR, *killer immunoglobulin-like receptors*). Na wyniki transplantacji mogą wpływać nie tylko niezgodności w układzie KIR – ligand KIR ale także haplotyp KIR występujący u dawcy.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska bardzo dobrze wpisuje się w nurt tych zagadnień. Temat rozprawy „*Wpływ immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR) u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku na wyniki leczenia i chimeryzm*” odpowiada pod względem merytorycznym jej treści. Jest to oryginalne opracowanie, zwłaszcza że dotyczy populacji pacjentów pediatrycznych, dla których danych literaturowych jest znacznie mniej niż dla populacji osób dorosłych.

Zasadniczy cel rozprawy, o którym częściowo informuje tytuł obejmował analizę roli KIR u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku kostnego oraz określenie wpływu układu receptorów KIR na komórkach dawcy i ich ligandów HLA na komórkach biorcy na: wyniki przeżycia i występowanie niekorzystnych zdarzeń, odnowę limfocytarną limfocytów T, B i komórek NK, wartość chimeryzmu hematopoetycznego.

Podjęte przez Doktorantkę zagadnienie badawcze uważam za oryginalne, aktualne i ważne z praktycznego punktu widzenia.

#### **Ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki i praktyki**

W ocenie uzyskanych rezultatów należy podkreślić, iż wnioski dotyczące wpływu KIR u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku na wyniki leczenia i chimeryzm zostały wyciągnięte w oparciu o analizę dokumentacji medycznej aż 202 pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu. Są one opisane na 41 stronach, udokumentowane 19 tabelami i 22 rycinami.

Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz wykazały, że najczęściej stwierdzanymi receptorami KIR, obecnymi w prawie całej populacji pacjentów są receptory 2DL1, 3DL1, 2DP1. Stwierdzono również, że co najmniej jeden haplotyp B był obecny u 79% dawców szpiku. Badania składu haplotypowego uwidocznily obecność haplotypu neutralnego u 91 dawców, lepszego u 87 a najlepszego u 21 dawców.

Doktorantka wykazała że na 2- i 5-letnie całkowite przeżycie (pOS, *overall survival probability*) oraz na przeżycie wolne od zdarzeń (EFS, *event-free survival*) istotnie wpływa dobór w zakresie HLA (korzystne: zgodny w zakresie HLA, zgodny w zakresie HLA-A, -B, -C, -DRB1), wskazanie do przeszczepienia (korzystny: choroba nienowotworowa) oraz układ KIR oznaczony przez Doktorantkę jako układ F (HLA z gr. C2 u biorcy / KIR 2DL1 u dawcy) oraz układ I (HLA z gr. Bw4 u biorcy / KIR3DS1 u dawcy).

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania uwidocznily natomiast, że śmiertelność związana z powikłaniami po transplantacji (TRM, *transplant related mortality*) jest istotnie większa w przypadku pacjentów niezgodnych w zakresie HLA-B, natomiast spośród poddanych analizie genotypów KIR i układów receptor KIR-ligand jedynie występowanie receptora 2DL5 oraz receptora 2DL5B wiązały się z większym ryzykiem TRM.

Doktorantka dokonała również oceny mechanizmów licencjonowania komórek NK, co ma ogromny walor poznawczy, jednakże niska liczba przypadków wykazujących zmianę licencjonowania w poszczególnych

grupach i różnorodność grupy nie pozwoliły na analizę przeżycia w zależności od kategoryzacji grup dla pojedynczych układów. W mojej opinii, jest to zachęta do prowadzenia dalszych badań w tym zakresie.

W dalszej części pracy Doktorantka dokonała oceny wybranych parametrów na odnowę limfocytarną, stwierdzając że zgodności w antygenach HLA mają wpływ na odnowę limfocytarną, szczególnie w pierwszych 60 dniach od zabiegu przeszczepienia komórek krwiotwórczych, natomiast w późniejszych punktach oceny (180, 270, 365 dni po transplantacji) nie wykazano istotnego związku. Doktorantka wykazała, że u pacjentów z brakiem zgodności w poszczególnych antygenach HLA (HLA-A, -B,-DRB1, słabiej HLA-C) występuje istotnie statystycznie niższa liczebność wybranych subpopulacji limfocytów w określonych dniach po transplantacji. Natomiast w odniesieniu do subpopulacji komórek NK nie wykazano, że zgodności w układzie HLA mają wpływu na ich rekonstrukcję. W dalszej, szczegółowej analizie związku genotypu receptora KIR z odnową limfocytarną Doktorantka udowodniła, że:

- u pacjentów, u których występuje receptor 2DL5 oraz u tych, u których występuje receptor 2DL5B stwierdzono mniejszą liczbę limfocytów T CD4+ w dniu +270,
- u pacjentów, u których występuje receptor 2DS3 stwierdzono istotnie mniejszą liczbę limfocytów B w dniu +365,
- u pacjentów, u których występuje receptor 2DS4ins stwierdzono istotnie większą liczbę limfocytów T CD4+ oraz B w dniu +90.

W dalszej, skrupulatnej analizie wybranych subpopulacji limfocytów u pacjentów z ekspresją lub brakiem ekspresji określonego układu ligand-receptor KIR Doktorantka stwierdziła, że:

- u pacjentów, u których występuje układ HLA A3 lub A11 KIR / 3DL2 (kod B) występuje istotnie wyższa liczba limfocytów T w dniu +30 ,
- u pacjentów, u których występuje układ haplotyp KIR B/x / KIR 2DS2 (kod C) stwierdzono istotnie wyższą liczbę limfocytów TCD4+ w dniu +30 oraz B w dniu +90,
- u pacjentów, u których występuje układ HLA z gr. C2 / KIR 2DS1 (kod G) stwierdzono istotnie niższą liczbę komórek NK w dniu +270 oraz +365,
- u pacjentów, u których występuje układ HLA z gr. Bw4 / KIR 3DS1 (kod I) stwierdzono istotnie niższą liczbę limfocytów T i B w dniu +270 oraz +365.

Ponadto Doktorantka stwierdziła, że źródło komórek krwiotwórczych do przeszczepienia (krew obwodowa/szpik kostny) a także zastosowanie globuliny antytymocytarnej (ATG, *anti-human T-lymphocyte globulin*) znacząco wpływają na odnowę limfocytarną.

Kolejna, bardzo istotna z klinicznego punktu widzenia analiza przeprowadzona przez Doktorantkę to analiza chimeryzmu poprzyszczepowego. Wykazała ona, że chimeryzm zależy on od choroby zasadniczej, która stanowi wskazanie do przeszczepienia, zgodności w HLA pary dawca-biorca, rodzaju kondycjonowania, obecności receptora 2DS1 oraz obecności układu HLA C04 lub A11/KIR 2DS (kod A). W grupie pacjentów z mieszanym chimeryzmem istotnie więcej pacjentów miało zgodność w układzie HLA. Doktorantka wykazała, że u pacjentów poddanych kondycjonowaniu z treosulfanem istotnie więcej pacjentów uzyskało pełny chimeryzm dawcy niż u pacjentów, u których zastosowano inny rodzaj kondycjonowania. Natomiast w grupie pacjentów z mieszanym chimeryzmem istotnie więcej było pacjentów przeszczepionych od dawcy

posiadającego ekspresję receptora 2DS1, a także istotnie więcej pacjentów nie posiadało ekspresji HLA C04 lub A11 / KIR 2DS4 (kod A).

W oparciu o wykonane badania i przeprowadzone analizy Doktorantka sformułowała 6 wniosków, które odpowiadają celom zaprezentowanym na wstępie dysertacji. Doktorantka stwierdziła, że:

- stopień zgodności między dawcą i biorcą w układzie HLA wywierał najsilniejszy wpływ na przeżycie pacjentów i odnowę limfocytarną w pierwszych 2 miesiącach po transplantacji, ale tylko w niewielkim stopniu na wysokość chimeryzmu po przeszczepieniu,
- układ F (HLA z gr. C2 / KIR 2DL1) i układ I (HLA z gr. Bw4 / KIR 3DS1) wiązały się z poprawą przeżycia po allo-HSCT, ale poza tym mechanizmy zależne od KIR tylko w ograniczonym zakresie wpływają na wyniki leczenia,
- ekspresji receptorów KIR lub różnych układów receptor KIR – ligand HLA towarzyszą złożone efekty modyfikujące przebieg rekonstrukcji immunologicznej lub wyniki chimeryzmu hematopoetycznego,
- ekspresja receptora 2DS4ins oraz układów B (HLA-A3 lub -A11 / KIR 3DL2) i C (haplotyp KIR B/x / KIR 2DS2) wiąże się z lepszą, a receptorów 2DL5, 2DL5B, 2DS3 oraz układów G (HLA z gr. C2 / KIR 2DS1) i I (HLA z gr. Bw4 / KIR 3DS1) z gorszą rekonstrukcją immunologiczną,
- ekspresja receptorów 2DL5 i 2DL5B jest związana z wyższą śmiertelnością około przeszczepową,
- ekspresja układu A (HLA-C04 lub -A11/ KIR 2DS4) jest związana z wyższym, a receptora 2DS1 z niższym prawdopodobieństwem uzyskania pełnego allogenicznego chimeryzmu.

Wnioski wypływające z rozprawy uważam za szczególnie wartościowe z praktycznego punktu widzenia. Dzięki ich uwzględnieniu możliwe jest lepsze dobranie dawcy dla konkretnego biorcy, tak by zoptymalizować sukces terapeutyczny. Ponadto uzyskane dane dotyczące rekonstrukcji układu immunologicznego po transplantacji mogą wpływać na interwencje terapeutyczne, takie wybór odpowiedniego czasu do rozpoczęcia szczepień ochronnych.

#### **Poprawność formalno-językowa**

Rozprawa zachowuje poprawność formalno-językową, stylistyczną i interpunkcyjną.

## **2. Ocena metodologiczna**

### **Dobór literatury i umiejętność wykorzystania źródeł**

W dysertacji zacytowano 97 pozycji piśmiennictwa, wszystkie niemal anglojęzyczne. Zdecydowana większość piśmiennictwa została opublikowana w ostatnich latach. Potwierdza to aktualność tematu oraz znajomość prezentowanych zagadnień i świadczy o umiejętnym wykorzystaniu źródeł naukowych. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę, że w pozycji 28 piśmiennictwa nie podano czasopisma z którego pochodzi cytowanie, ani numeru DOI, podano natomiast tytuł w języku polskim i angielskim. Artykuł ten został opublikowany w Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej w 2004 (prawidłowe cytowanie: Kuśnierczyk P. Rola immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR) w chorobach człowieka. Postępy

Hig Med Dosw 2004:259-263). Nie umniejsza to w żaden sposób wartości pracy, a wymaga jedynie niewielkiej korekty podczas przygotowania pracy do publikacji.

#### **Poprawność formułowania problemów i hipotez (założenia badawcze)**

Cel dysertacji został sformułowany prawidłowo i szczegółowo doprecyzowany w celach szczegółowych. Obejmował on analizę roli immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR) u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku kostnego oraz określenie wpływu układu receptorów KIR na komórkach dawcy i ich ligandów HLA na komórkach biorcy na: (1) wyniki przeżycia i występowanie niekorzystnych zdarzeń, (2) odnowę limfocytarną limfocytów T, B i komórek NK, (3) wartość chimeryzmu hematopoetycznego.

Założenia badawcze zrealizowano poprawnie dokumentując je szeroko opisanymi wynikami. Podjęte przez Doktorantkę zagadnienie badawcze jest bez wątpienia oryginalne, aktualne, ważne i praktyczne.

#### **Trafność doboru metod i narzędzi badawczych umiejętność ich zastosowania**

Do realizacji celów badawczych Doktorantka posłużyła się retrospektywną analizą elektronicznej dokumentacji medycznej pacjentów poddanych procedurze allogenicznego przeszczepienia szpiku kostnego w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu w latach 2003-2018. Doktorantka szczegółowo opisała metodologię poszczególnych badań laboratoryjnych, których wyniki zostały wykorzystane do przygotowanie dysertacji (ocena odnowy limfocytarnej, badanie chimeryzmu poprzez szczepowego, genotypowanie KIR).

W pracy dokonano analizy statystycznej z zastosowaniem programu „R” wersja 4.0. Odpowiednio dobrana, rozbudowana analiza statystyczna umożliwiła poprawną prezentację otrzymanych wyników badania.

#### **Poprawność układu pracy i struktury podziału treści**

Rozprawa doktorska lek. Elżbiety Róży Wawrzyniak-Dzierżek jest estetyczną, starannie przygotowaną monografią liczącą 99 stron, obejmującą: wykaz skrótów, spis tabel, spis rycin, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz cytowaną literaturę. Układ ten jest typowy dla rozpraw doktorskich. Dysertacja zawiera 21 tabel i 26 rycin.

We wstępie Doktorantka wprowadza w zagadnienie przeszczepiania komórek krwiotwórczych, strategię doboru dawcy, zagadnienia immunologiczne ze szczególnym uwzględnieniem komórek NK oraz immunoglobulinopodobnych receptorów KIR, monitorowania chimeryzmu po transplantacji. Wszystkie zagadnienia są wsparte aktualnym piśmiennictwem i uzasadniają celowość podjęcia projektu badawczego. W szerokiej dyskusji Doktorantka przedstawia wyniki uzyskane przez innych autorów i ustosunkowuje je do wyników uzyskanych w rozprawie. Ten rozdział (dyskusja) zasługuje na szczególne uznanie – czyta się sprawnie, jego struktura jest przejrzysta, a całość zamyka tabela nr 21, w której Doktorantka zbiorczo prezentuje istotnie statystycznie wyniki swoich badań z uwzględnieniem efektu klinicznego wywieranego przez dany parametr. Całość pracy podsumowuje sześć trafnych wniosków.

### 3. Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam że rozprawa doktorska lek. Elżbiety Róży Wawrzyniak-Dzierżek jest oryginalnym, nowatorskim opracowaniem autorki, mającym znaczenie dla rozwoju wiedzy, nauki oraz praktyki klinicznej.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art.13. ust. ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz 595, z późn. zm.) stawianym jako wymóg dla rozpraw doktorskich. Przedstawioną rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medycze Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Elżbiety Róży Wawrzyniak-Dzierżek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, w związku unikatowym znaczeniem przeprowadzonych badań, jej perfekcyjnym opracowaniem metodologicznym i statystycznym oraz trafną analizą wyników, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy.



dr hab. n. med. i n. o zdr. Krzysztof Czyżewski, prof. UMK

2002908 | dr hab. n. med. i n. o zdr.  
**Krzysztof Czyżewski, prof. UMK**  
lekarz specjalista pediatrii,  
onkologii i hematologii dziecięcej,  
transplantologii klinicznej  
tel. 886 855 517