



Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/7037/2022 P
Data: 2022-05-16

Wrocław, 10. 05. 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Elżbiety Wawrzyniak-Dzierżek
Tytuł rozprawy: Wpływ immunoglobulinopochodnych receptorów komórek
cytotoksycznych (KIR) u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku na wyniki
leczenia i chimeryzm
Promotor: prof. n. med. Marek Ussowicz

Zgodnie z uchwałą nr 425/II/2022 Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z dnia 17 lutego 2022r. o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej lek. Elżbiety Wawrzyniak-Dzierżek pod tytułem: „Wpływ immunoglobulinopochodnych receptorów komórek cytotoksycznych (KIR) u dzieci po allogenicznym przeszczepieniu szpiku na wyniki leczenia i chimeryzm” mam przyjemność przedstawić następującą opinię.

Allogeniczny przeszczep komórek hematopoetycznych jest obecnie uznaną i szeroko stosowaną metodą terapeutyczną zalecaną w przypadku schorzeń wynikających z zaburzeń hematopoezy. U dzieci, przeszczep allogeniczny wykonywany jest zazwyczaj w przypadku chorób nowotworowych, w tym białaczek, jak również wrodzonych niedoborów odporności lub chorób metabolicznych. Pomimo znacznej poprawy bezpieczeństwa i skuteczności tej metody terapeutycznej oraz ograniczenia jej skutków ubocznych, nadal dużym problemem są powikłania w postaci poważnych infekcji związanych z niewydolnością układu immunologicznego oraz choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi. Ponadto, w przypadku chorób nowotworowych istotny problem stanowią nawroty choroby podstawowej po przeszczepieniu. Obecnie dobór odpowiedniego dawcy allo-HSCT opiera się przede wszystkim na ocenie zgodności w HLA dawcy i biorcy. Wobec wzrastającej popularności przeszczepień szpiku od dawców częściowo zgodnych w HLA, pojawia się pytanie o mechanizmy biorące udział w rekonstytucji immunologicznej. Dotychczasowe badania wskazują, że komórki NK pełnią ważną rolę w tym procesie, a ich alloreaktywność zależna od genotypu KIR może mieć znaczenie w podtrzymaniu efektu przeciwnowotworowego i w eliminacji przetrwałej hematopoezy autologicznej oraz ustaleniu chimeryzmu.



W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej, Doktorantka podjęła się zbadania związku pomiędzy układem receptorów KIR na komórkach dawcy i ich ligandów HLA na komórkach biorcy oraz genotypem KIR dawcy a wynikami przeżycia i występowania niekorzystnych zdarzeń, odnową limfocytów T, B i komórek NK oraz wartością chimeryzmu hemtopoetycznego u dzieci. Podjęcie takiej tematyki jest jak najbardziej uzasadnione ze względu na mało do tej pory poznany wpływ reakcji odpornościowych zależnych od genotypu KIR i aktywności komórek NK na występowanie powikłań po przeszczepie szpiku. Poznanie roli komórek NK oraz mechanizmów biologicznych związanych z funkcją receptorów KIR w patogenezie niekorzystnych zdarzeń po przeszczepie szpiku może przyczynić się do ustalenia uzupełniających kryteriów doboru dawców, a w konsekwencji uzyskania lepszych wyników leczenia.

Rozprawa liczy 99 stron druku i posiada układ typowy dla prac doświadczalnych – składa się z wykazu skrótów, spisu tabel i rycin, wstępu, celu pracy, opisu materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i języku angielskim oraz bibliografii. Pod względem redakcyjnym praca nie budzi zastrzeżeń, a proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są odpowiednio zachowane. Wykorzystanie bogatej bazy piśmiennictwa świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki oraz dojrzałym warsztacie badawczym Doktorantki.

We wstępie Doktorantka opisuje zagadnienie przeszczepu komórek hematopoetycznych poczynając od omówienia wskazań do allogenicznego przeszczepienia komórek hematopoetycznych oraz strategii doboru dawcy do transplantacji szpiku kostnego. Poruszona została również tematyka alloreaktywności i odnowy immunologicznej po przeszczepieniu szpiku. Dużo miejsca Doktorantka poświęciła na dokładne omówienie udziału komórek NK i immunoglobulinopodobnych receptorów komórek cytotoksycznych w transplantacji szpiku. W tej części opisane zostały szczegółowo budowa i funkcja receptorów KIR, zjawisko polimorfizmu allelicznego i haplotypowego w obrębie genów kodujących białka KIR oraz wpływ poszczególnych haplotypów KIR na efekt transplantacji. W ostatniej części wstępu Autorka omówiła również zagadnienie licencjonowania komórek NK i zjawisko chimeryzmu po przeszczepie.

Podsumowując, wstęp posiada edukacyjny charakter i stanowi solidne wprowadzenie w omawiane zagadnienie. Dodatkowe informacje przedstawione w postaci tabel i rycin stanowią ważne uzupełnienie informacji zawartych we wstępie.

Cel pracy został dobrze dobrany i jasno sformułowany.

Rozdział „Materiały i Metody” zawiera informacje na temat grupy badanej oraz zakresu analiz wykonanych z wykorzystaniem danych retrospektywnych. W badaniach Doktorantka



zastosowała technikę cytometrii przepływowej w celu określenia odnowy limfocytarnej w wybranych punktach czasowych po transplantacji szpiku. Do ilościowej analizy chimeryzmu zastosowano metodę STR/VNTR określającą krótkie tandemowe powtórzenia względem zmiennej liczby tandemowych powtórzeń, która wykorzystuje różnice w sekwencji DNA pomiędzy dawcą a biorcą. Uzyskane dane były analizowane w programie Gene Mapper V4.1. Do genotypowania KIR Doktorantka zastosowała dedykowany zestaw odczynników, a analizy przeprowadzone zostały z użyciem ogólnie dostępnych programów umożliwiających określenie grup ligandowych u dawcy i biorcy oraz składu haplotypowego KIR.

Podsumowując, Rozdział „Materiały i Metody” zawiera wszystkie niezbędne informacje o wykorzystanych procedurach badawczych. Zamieszczony opis metod statystycznych wskazuje natomiast, że analiza statystyczna została przeprowadzona w sposób prawidłowy za pomocą odpowiednio dobranych testów statystycznych. Biorąc jednak pod uwagę, że jest to rozdział „Materiały i Metody” brakuje tutaj spisu odczynników i sprzętu, które były stosowane podczas prowadzonych badań.

Rozdział „Wyniki” został podzielony na dziewięć podrozdziałów. W części pierwszej i drugiej Doktorantka przedstawiła dane dotyczące charakterystyki badanej populacji oraz informacje na temat przeszczepu. Grupę badaną stanowiło 202 biorców allogenicznym przeszczepów szpiku w wieku 2 miesiące do 29 lat (mediana 6,8 roku). Do grupy badanej zakwalifikowano zarówno pacjentów z diagnozą nowotworową (89) jak i nienowotworową (113). Wśród parametrów charakteryzujących przeszczep uwzględniono zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA, rodzaj kondycjonowania, źródło komórek macierzystych oraz rodzaj stosowanej profilaktyki GvHD.

W kolejnym podrozdziale przedstawione zostały wyniki dotyczące częstości występowania genotypów KIR i określonych układów receptor - ligand w badanej populacji. Doktorantka wykazała, że receptory 2DL1, 3DL1 i 2DP1 występowały u ponad 90% badanych dawców, podczas gdy receptory 2DS3 i 2DS5 były najrzadziej odnotowywane. Natomiast, co najmniej jeden haplotyp B, składający się z kombinacji genów aktywujących, stwierdzono u 79% dawców szpiku. Autorka opisała również częstość występowania układów receptor KIR dawcy - ligand HLA biorcy. Z badań wynika, że w badanej grupie pacjentów po przeszczepie częstość występowania układów oznaczonych kodem C, D, F i H wynosiła ponad 50%.

W podrozdziale czwartym Doktorantka zebrała wyniki przedstawiające wpływ wybranych parametrów na prawdopodobieństwo 2- i 5-letniego przeżycia w badanej populacji. Wśród porównywanych parametrów, oprócz receptorów KIR i układów receptor KIR – ligand, zostały uwzględnione również takie parametry jak płeć pacjenta, zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA, wskazanie do przeszczepu, rodzaj kondycjonowania, czy rodzaj profilaktyki GvHD. Wykazano, że stopień zgodności między dawcą a biorcą w układzie HLA wpływa na przeżycie pacjentów. Ponadto, istotny wpływ na przeżycie odnotowano również u pacjentów, u których zidentyfikowano układ receptor KIR – ligand oznaczony kodem F i I. Wyniki, dla których



uzyskano istotności statystyczne, przedstawiono w postaci krzywych przeżycia dla wybranych grup pacjentów.

Doktorantka wykonała również analizę pokazującą wpływ opisanych powyżej parametrów na przeżycie wolne od zdarzeń (EFS – event free survival), której wyniki przedstawiła w kolejnej części rozdziału „Wyniki”. W tym przypadku wyższe EFS odnotowano dla pacjentów zgodnych w HLA z dawcami, u pacjentów z chorobą nienowotworową oraz u pacjentów, u których wykazano obecność układu receptor KIR – ligand o symbolu F i I. Tak jak powyżej, nie stwierdzono znamiennej zależności pomiędzy poszczególnymi genotypami KIR i pozostałymi układami receptor KIR – ligand.

W kolejnej części przedstawione zostały wyniki dotyczące analizy wpływu wybranych parametrów na częstość zgonów związanych z powikłaniami po transplantacji (TRM – transplant related mortality). Doktorantka wykazała, że prawdopodobieństwo TRM jest istotnie wyższe w przypadku pacjentów niezgodnych w HLA-B. Natomiast, spośród poddanych analizie genotypów KIR i układów receptor KIR – ligand jedynie występowanie receptorów 2DL5 i 2DL5B wiązało się z większym ryzykiem TRM.

Wyniki oceny mechanizmów licencjonowania komórek NK ujawniły, że w badanej grupie pacjentów, tylko w 16 przypadkach obserwowano zjawisko delicensjonowania, a w 10 licencjonowania wzrastającego. Zbyt mała liczba przypadków wykazujących zmianę licencjonowania komórek NK w poszczególnych grupach, jak również różnorodność grupy nie pozwoliły na analizę przeżycia w zależności od kategoryzacji grup. Jak podkreśla Doktorantka, licencjonowanie komórek NK jest zjawiskiem rzadko występującym u pacjentów po przeszczepie ze względu na konieczność współwystępowania niezgodności w HLA pomiędzy dawcą i biorcą oraz obecność genu dla receptora KIR u dawcy. Z tego powodu, ocena roli licencjonowania komórek NK wymaga badań na dużych populacjach.

W dalszej części opisu wyników Doktorantka przedstawiła wyniki określające wpływ wybranych parametrów na odnowę limfocytarną w różnych punktach czasowych po przeszczepie. Z przedstawionych danych wynika, że zgodność w antygenach HLA ma wpływ na odnowę limfocytarną, szczególnie w pierwszych 60 dniach od przeszczepu. Wyniki wskazują również, że ekspresja receptora 2DS4ins oraz układów B i C wiąże się z lepszą, a receptorów 2DL5, 2DL5B, 2DS3 oraz układów G i I z gorszą rekonstytucją immunologiczną. Doktorantka podkreśla, że przebieg odnowy immunologicznej jest procesem złożonym, który może być modyfikowany jednocześnie przez różne czynniki.

W ostatniej części sekcji „Wyniki” zamieszczone zostały dane dotyczące analizy chimeryzmu przeprowadzonej w kontekście współistnienia analizowanych czynników. Doktorantka wykazała, że wyniki chimeryzmu (całkowity vs mieszany) zależą od choroby zasadniczej stanowiącej wskazanie do przeszczepu i zgodności w HLA. Istotnymi czynnikami w tym aspekcie okazały się również rodzaj kondycjonowania oraz obecność 2DS1 i układu A. Doktorantka zaobserwowała, że wśród pacjentów poddanych kondycjonowaniu z zastosowaniem treosulfanu, istotnie więcej uzyskało pełny chimeryzm dawcy niż w pozostałych rodzajach



kondycjonowania. Dodatkowo, w grupie pacjentów z mieszanym chimeryzmem było istotnie więcej pacjentów od dawcy posiadającego ekspresję receptora 2DS1, a znaczący odsetek pacjentów z tej grupy nie posiadał ekspresji układu A.

Podsumowując, rozdział „Wyniki” stanowi główną część pracy zawierającą łącznie 21 rycin i 19 tabel. Zarówno opis, jak i sposób przedstawienia danych nie budzą zastrzeżeń. Należy tutaj podkreślić, że wszystkie analizy dotyczące wpływu KIR na wyniki przeżycia, występowanie niekorzystnych zdarzeń, odnowę limfocytarną i chimeryzm zostały wykonane łącznie z oceną innych parametrów takich jak płeć pacjenta, zgodność dawcy i biorcy w układzie HLA, wskazanie do przeszczepu, rodzaj kondycjonowania, czy rodzaj profilaktyki GvHD. Kompleksowe podejście do problemu badawczego pozwoliło w tym przypadku na uwzględnienie złożonych efektów, które mogą modyfikować aktywność komórek NK i wpływać na efekt terapeutyczny. Dane zostały zaprezentowane w sposób czytelny, a opis wyników jest wyważony. W podpisach pod rysunkami można zauważyć nieliczne potknięcia językowe (tj. „ilość pacjentów”). Paza tym, rozdział ten, jak i cała praca, zarówno pod względem merytorycznym, jaki i edytorskim zostały przygotowane bardzo starannie.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka w sposób zwięzły i rzeczowy skonfrontowała uzyskane wyniki z dostępnym piśmiennictwem, wykazując się zdolnością kojarzenia faktów i dobrą znajomością piśmiennictwa opisującego zagadnienie. Oprócz dyskusji uzyskanych wyników z doniesieniami opublikowanymi przez inne zespoły, w rozdziale tym Doktorantka wskazała również problemy wymagające dalszych badań oraz możliwości wykorzystania zdobytej wiedzy. Na uwagę zasługuje powściągliwość Doktorantki w wyciąganiu wniosków. Dyskusja została zakończona krótkim rozdziałem podsumowującym, w którym Autorka zamieściła tabelę, zawierającą zestawienie istotnie statystycznie wyników dotyczących receptorów KIR i układów receptor KIR – ligand HLA.

W ostatniej części pracy Doktorantka zamieściła wnioski w formie 6 podpunktów. Wnioski zostały sformułowane poprawnie, adekwatnie do uzyskanych wyników.

W ogólnej ocenie merytorycznej stwierdzam, że postawione przez Doktorantkę cele zostały prawidłowo zrealizowane, a wnioski poparte są starannie zaplanowanymi i wykonanymi badaniami i analizami. Doktorantka wykazała się również znajomością aktualnego stanu wiedzy w temacie badań oraz w sposób poprawny i wyważony interpretowała uzyskane wyniki. Do ważniejszych elementów rozprawy zaliczam niewątpliwie identyfikację receptorów KIR (2DL5 i 2DL5B), których występowanie na komórkach dawcy może wiązać się ze słabszą odnową immunologiczną i większym ryzykiem zgonów związanych z powikłaniami po transplantacji. Niniejsza praca stanowi oryginalne opracowanie, a uzyskane wyniki wnoszą nie tylko element poznawczy, ale również wskazują, że genotypowanie KIR może mieć znaczenie praktyczne jako dodatkowe kryterium doboru dawcy.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZTELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Na podstawie przeprowadzonej analizy rozprawy doktorskiej lek. Elżbiety Wawrzyniak-Dzierżek stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego i spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Treść rozprawy wskazuje na wysoki poziom wiedzy naukowej Doktorantki oraz świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. W związku z powyższym, mam przyjemność przedstawić wniosek o dopuszczenie lek. Elżbiety Wawrzyniak-Dzierżek do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Składam również wniosek o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

dr hab. Joanna Rosowska
Joanna Rosowska
Kierownik Międzyzakładowej Pracowni
Cytometrii i Mikroskopii Konfokalnej IITD PAN