

## **Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anny Kędzierskiej**

**pod tytułem: „Tregitopy – nowe cząsteczki immunoregulatorowe w  
mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem”**

**(ang. “Tregitopes as a novel immunoregulators of pregnancy  
tolerance in mouse abortion prone model”).**

### **Ocena merytoryczna**

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

Zaburzenia regulacji procesów immunologicznych w ciąży są jednym z czynników ryzyka, które zwiększają prawdopodobieństwo odrzucenia zarodka i niepowodzeń rozrodu, w tym nawracających poronień (ang. recurrent miscarriage- RM) oraz nawracających niepowodzeń implantacji (ang. RIF- recurrent implantation failure). Dlatego wydaje się, że poznanie mechanizmów regulacji tych procesów jest niezwykle istotne dla wprowadzenia nowych terapii immunomodulujących zapewniających optymalny i efektywny przebieg procesów rozrodczych (Parhizkar F et al., Immunol Lett, 2021). Równowaga cytokin Th1/Th2/Treg/Th17 warunkuje prawidłowy przebieg rozrodu i jest kluczowa dla powodzenia ciąży. Peptydy znajdujące się w ludzkich i mysich immunoglobulinach (IgG) mogące indukować ekspansję Tregs to tregitopy (epitopy komórek Treg) i mają one wysokie powinowactwo do wiązania z ludzkimi antygenami głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHCII). Tregs, które rozpoznają tregitopy, ulegają aktywacji i wytwarzają IL-10 (Cousens L et al., Hum Immunol, 2014). Wiadomo, że gdy dochodzi do wzrostu stężenia prozapalnych cytokin Th1 (interferonu- $\gamma$  czy TNF- $\alpha$ ), a spadku stężenia cytokin

Th2 np. interleukiny-10 wzrasta ryzyko niepowodzeń rozrodu: nawracających poronień, nawracających niepowodzeń implantacji, porodu przedwczesnego i stanu przedrzucawkowego (Saito S et al., Am J Reprod Immunol, 2010; Verma S et al., Am J Reprod Immunol, 2019). Zespół policystycznych jajników (PCOS), najczęstsza przyczyna niepłodności u kobiet jest powiązany z otyłością i także z przewlekłym stanem zapalnym. Ponadto, najnowsze badania wskazują, że aktywacja makrofagów jajnika oraz zaburzenia właśnie równowagi limfocytów Th17 (CD4<sup>+</sup>IL17A<sup>+</sup>) i Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> odgrywają kluczową rolę w patogenezie tego zespołu (Albaghdadi AJH et al. Sci Rep, 2019; Alissa EM et al., J Obstet Gynaecol Res 2021; Gnanadass SA et al., Arch Gynecol Obstet, 2021). Wyzwaniem dla ochrony zdrowia, w tym zdrowia reprodukcyjnego stała się ponadto pandemia Covid-19. Uważa się, że kobiety w ciąży są bardziej narażone na ciężką zachorowalność i śmiertelność w przypadku zakażenia SARS-CoV-2, a właśnie brak równowagi Treg/Th17 charakteryzuje niekontrolowane ogólnoustrojowe zapalenie w ciężkim przebiegu Covid-19 w ciąży (Muyayalo KP et al., Am J Reprod Immunol, 2020). Dlatego praca mgr Anny Kędzierskiej tak doskonale wpisuje się w aktualne wyzwania współczesnego świata.

Rozprawa została przygotowana zgodnie z aktualnym trybem przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich w formie monotematycznego cyklu artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych. Do rozprawy włączono trzy spójne pod względem tematycznym publikacje oryginalne. Chciałabym podkreślić, że powyższe publikacje to prace w recenzowanych, anglojęzycznych czasopiśmie o sumarycznym czynniku wpływu IF ponad 12, a doktorantka jest pierwszym autorem dwóch z trzech publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Opublikowanie wyników badań w renomowanych czasopiśmie naukowych jest dodatkowym przekonującym dowodem na poprawność i atrakcyjność tematyczną prezentowanych badań.

Ponieważ większość wyników została sprawdzona przez niezależnych recenzentów międzynarodowych czasopism, rola recenzenta jest dość ograniczona. Czasopisma, z których pochodzą prace stanowiące rozprawę mają staranny system oceny zgłaszanych prac. W praktyce dwóch lub trzech recenzentów musi wysoko ocenić wartość naukową, sposób prezentacji i poprawność uzyskanych wyników. Toteż monotematyczny cykl publikacji w renomowanych czasopismach naukowych jest przekonującym dowodem wysokiego poziomu prezentowanych badań. Szczególnie chciałabym podkreślić wybitną wartość pracy opublikowanej w Sci Rep, 2020, z możliwością open access.

Praca zawiera 72 strony, podzielona jest na 7 części, w tym wydruki 3 publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Doktorantka załącza streszczenie pracy zarówno w języku polskim, jak i angielskim. Autorka dołącza także oświadczenia współautorów (ang. author's declarations) potwierdzających jej znaczący udział w realizacji badań i przygotowaniu manuskryptów oraz wnioski (ang. conclusions) w języku angielskim.

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

Przedstawiona mi do oceny praca jest oparta o cykl 3 publikacji oryginalnych:

1. Krystyna Marta Okoniewska, **Anna Ewa Kedzierska**, Jakub Okoniewski, Anna Slawek, Krzysztof Grzymajlo, Anna Chelmonska-Soyta, Tomasz Grabowski, New Tregitopes Inducing Adaptive Regulatory T Cells, Journal of Physiology and Pharmacology, 2017, 68(6), 897-906.
2. **Anna Ewa Kedzierska**, Daria Lorek, Anna Slawek, Anna Chelmonska-Soyta, Tregitopes regulate the tolerogenic immune response and

decrease the foetal death rate in abortion-prone mouse matings, Scientific Reports, 2020, 10(1):10531.

3. **Kedzierska Anna Ewa**, Lorek Daria, Slawek Anna, Grabowski Tomasz, Chelmonska-Soyta Anna. CD91 Derived Treg Epitope Modulates Regulatory T Lymphocyte Response, Regulates Expression of Costimulatory Molecules on Antigen-Presenting Cells, and Rescues Pregnancy in Mouse Pregnancy Loss Model. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(14):7296.

Doktorantka przyjęła następujący cel badawczy: **zbadanie czy znane mysie tregitopy i zaprojektowane *in silico* nowe potencjalne tregitopy rozpoznawane przez receptor limfocytów T regulatorowych uczestniczą w rozwoju tolerancji w przebiegu ciąży u myszy**. Autorka sformułowała także dobrze zaplanowane cele szczegółowe:

1. weryfikacja funkcjonalności nowych potencjalnych tregitopów w indukowaniu ekspansji limfocytów T regulatorowych, którego opracowanie i uzyskane wyniki zaprezentowano w pracy Okoniewska i wsp., (2017).
2. zbadanie czy wczesne podanie dwóch epitopów o znanych sekwencjach pochodzących z mysiej IgG, mysiego tregitopu 167 i 289 może zapobiegać poronieniu w mysim modelu ciąży podatnej na poronienia, którego opracowanie i uzyskane wyniki zaprezentowano w pracy Kedzierska i wsp., (2020).
3. zbadanie czy wczesne podanie wyselekcjonowanych potencjalnych tregitopów zapobiega poronieniu w mysim modelu ciąży podatnej na poronienia, którego opracowanie i uzyskane wyniki zaprezentowano w pracy Kedzierska i wsp., (2021).

Przyjęte cele szczegółowe są logiczną konsekwencją zaplanowanego celu ogólnego. Opisane w publikacjach wnioski zawierają uzasadnienie podjętych

badania i rzetelne omówienie uzyskanych wyników. Doktorantka formułuje następujące wnioski podsumowujące otrzymane wyniki:

1. Analiza *in vitro* zaprojektowanych sekwencji, umożliwiła pozytywną weryfikację tolerogennego potencjału dwóch nowych tregitopów.
2. Podaż dwóch tregitopów o znanych sekwencjach pochodzących z mysiej IgG znacząco zwiększyła odsetek limfocytów T regulatorowych, produkcję IL-10 przez Tregs i Bregs oraz zmieniła odpowiedź kostymulacyjną komórek prezentujących antygen, przyczyniając się tym samym do zmniejszenia śmiertelności płodów w mysim modelu ciąży skłonny do poronień.
3. Podaż nowego peptydu zlokalizowanego w cząsteczce CD91 (SGS) myszom skłonny do poronień spowodowała zwiększenie proporcji Tregs wśród limfocytów T, podwyższenie stężenia IL-2 i IL-10 w surowicy oraz obniżenie ekspresji cząsteczek kostymulujących na APC, przyczyniając się tym samym do ustalenia stanu tolerancji i zmniejszenia śmiertelności płodów.
4. Zaprojektowany *in silico* peptyd SGS spełnia kryteria tregitopu, ponieważ jego sekwencja jest obecna w białkach ludzkich, jest konserwatywna i może wiązać się z MHCII.

Wnioski są logiczną konsekwencją postawionych w badaniach celów.

### **Poprawność formalno – językowa, stylistyczna i interpunkcyjna**

Poprawność formalno – językowa, stylistyczna i interpunkcyjna prac w języku angielskim (publikacji) została zweryfikowana przez redakcje czasopism przyjmujących je do druku. Autorka załączyła streszczenia w języku polskim i w angielskim. Ta część została napisana poprawnie pod względem językowym i nie ma problemu ze zrozumieniem zarówno przedstawianych treści, jak i toku

rozumowania doktorantki. Praca w tej części jest więc napisana poprawną polszczyzną, bez większych uchybień stylistycznych i gramatycznych. Drobne błędy językowe i interpunkcyjne nie umniejszają wartości pracy: przykładowo preferuję, by w języku polskim używać określenia stężenie cytokin, a nie ich poziom.

### **Ocena metodologiczna**

#### **Dobór literatury, umiejętności wykorzystania źródeł**

Autorka bardzo sprawnie porusza się w tematyce badawczej, cytując również najnowsze dane literaturowe ostatniej dekady.

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

Autorka bardzo dobrze określiła przedmiot badań. Należy podkreślić znaczenie aplikacyjne badań peptydu SGS, który może naśladować tolerogenne działanie znanych tregitopów i w przyszłości może być wykorzystany w strategiach terapeutycznych w przypadku niepowodzeń ciąży. Takie podejście właściwie odzwierciedla obecnie panujące w nauce trendy polegające na translacji wyników badań podstawowych do zastosowań w praktyce klinicznej. Wyzwaniem przyszłości może być wykorzystanie uzyskanych wyników w modelu mysim w rozrodzie człowieka.

#### **Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania**

Doktorantka wraz z zespołem współautorów przeprowadziła badania w odpowiednio zdefiniowanych i scharakteryzowanych grupach. Badania prowadzono z wykorzystaniem właściwych technik hodowli komórkowej, magnetyczne sortowanie komórek, wieloparametryczną analizę cytometryczną i metody ELISA oraz odpowiednich narzędzi statystycznych. Wyniki prac badawczych zostały zawarte w pracach oryginalnych, opublikowanych w czasopiśmie anglojęzycznych i wysoko ocenione przez międzynarodowe grono ekspertów. Spełniają one wymagania zarówno pod względem doboru grupy

badanej i grupy kontrolnej, metod doświadczalnych, jak i jakości oraz sposobu prezentacji wyników. Badania uzyskały ponadto zgody odpowiednich komisji etycznych.

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

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma odpowiedni dla tego typu opracowań układ. Wydruki publikacji stanowiących rozprawę doktorską także zostały dołączone.

### **Wniosek końcowy (konkluzja)**

Pracę Pani **mgr Anny Kędzierskiej** pod tytułem: **„Tregitopy – nowe cząsteczki immunoregulatorowe w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem”** (ang. **“Tregitopes as a novel immunoregulators of pregnancy tolerance in mouse abortion prone model”**) oceniam niezwykle wysoko. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną, umiejętnością twórczej, samodzielnej pracy naukowej oraz zdolnością krytycznej analizy i prezentacji wyników. Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w myśl art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669 i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Anny Kędzierskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, dziękując za przywilej tej recenzji. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie tej pracy.

Prof. dr hab. med. Małgorzata Jerzak

Warszawa 4.10.2021

6715738 Prof. dr hab. med. Małgorzata Jerzak  
specjalista położnictwa i ginekologii  
specjalista ginekologii onkologicznej  
tel. 604 208 955