



Warszawa, 9 czerwca 2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Jacek Nowak
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
ul. Indiry Gandhi 14
02-776 Warszawa

Recenzja

Oddano mi do recenzji manuskrypt rozprawy doktorskiej magister inżynier **Karoliny Piekarskiej** pod tytułem **"Rola KIR, ich ligandów HLA-C i HLA-G oraz aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej w nawracających niepowodzeniach implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym"**.

Rozprawa doktorska została wykonana w Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej Zakładu Immunologii Klinicznej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk. Promotorem pracy była **doktor habilitowana Izabela Nowak**.

Badania były współfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektów grantowych Opus oraz Preludium. Projekt Opus był kierowany przez Promotorkę doktoratu, doktor habilitowaną **Izabelę Nowak** natomiast Projektem Preludium kierowała doktorantka. Należy podkreślić, że jest to przykład wzorowej współpracy pomiędzy promotorem a młodymi kadrami naukowymi nad rozpoczęciem drogi naukowej i dalszym rozwojem naukowym. W latach 2017-2022 części wyników pracy zostały opublikowane w czasopismach z Impact Factorem, takich jak *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *Frontiers of Immunology* czy *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Wśród tych czasopism *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* można zaliczyć do czasopism o średniowysokim Impact Factor (IF=7.561). We wszystkich pięciu pracach doktorantka była początkowo drugim, a

później pierwszym autorem co wskazuje na dominujący udział autorki w powstaniu tych publikacji oraz bardzo wysoką wartość naukową i jakość rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska składa się z dwóch części, tj. zeszytu zasadniczego liczącego 219 stron i Suplementu liczącego 80 stron. Treść pracy poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów stosowanych w pracy i składa się z kilku klasycznych rozdziałów takich jak: Wstęp, Założenia i cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja a następnie Wnioski. Na zakończenie pracy sporządzono spis rycin i tabel zamieszczonych w pracy oraz wykaz piśmiennictwa. Praca zawiera 56 rycin i 44 tabele w swojej części zasadniczej. Suplement obejmuje 23 uzupełniające tabele, których treść zawiera częstości genów, częstości genotypów u osób badanych, a także częstości kombinacji układów genetycznych pomiędzy kobietami poddanymi zabiegowi zapłodnienia pozaustrojowego a ich partnerami. Wykaz piśmiennictwa obejmuje 376 prawidłowo wyselekcjonowanych pozycji aktualnej literatury, w większości z lat 2012-2022. Proporcje zawartości treściowej poszczególnych rozdziałów są rozsądne, a dodatkowo należy podkreślić, że wykonano bardzo dużą liczbę badań zarówno genetycznych jak i stężeń poszczególnych komponentów białkowych.

Temat wybrany przez doktorantkę jest bardzo ważny. Dotyczy on leczenia małżeńskiej niepłodności metodą zapłodnienia pozaustrojowego. Niepłodność jest nie tylko nasilającym się problemem medycznym, ale i społecznym. Założenia pracy zostały sformułowane w interesujący sposób, bowiem dotyczyły one poszerzenia naszej wiedzy w zakresie genetycznych i białkowych wyznaczników implantacji zarodka w macicy podczas procedury in vitro fertilization (IVF), czyli zapłodnienia pozaustrojowego.

Głównym celem pracy była ocena związku polimorfizmu genów KIR i ich ligandów HLA-C i HLA-G oraz aminopeptydaz ERAP1 i ERAP2 z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym. Doktorantka postawiła sobie również ambitne cele dodatkowe takie, jak zbadanie stężenia cząsteczek białkowych aminopeptydaz ERAP1 i ERAP2 w osoczu krwi u kobiet przystępujących do zapłodnienia in vitro. Celem było również zbadanie stężenia rozpuszczalnych cząsteczek HLA-G w osoczu kobiet przystępujących do zapłodnienia in vitro. Co istotne, badania te przeprowadzono zarówno przed rozpoczęciem procedury IVF, jak i po przeprowadzeniu tej procedury, co jest oryginalnym ujęciem na skalę światową. Dodatkowo podjęto się próby oceny roli rozpuszczalnych cząsteczek sHLA-G w męskiej niepłodności. Stężenia rozpuszczalnych cząsteczek HLA-G badano w nasieniu mężczyzn, partnerów kobiet przystępujących do zapłodnienia IVF. Zbadano również korelacje tych stężeń

z parametrami genetycznymi takimi jak haplotypy i diplotypy HLA-G u mężczyzn, partnerów badanych kobiet.

Materiał do badań pochodził z renomowanych klinik zajmujących się leczeniem niepłodności z Łodzi, Rzgowa, Wrocławia i Warszawy, a pary rodzicielskie były kwalifikowane i prowadzone przez doświadczonych lekarzy. Grupę badaną stanowiło 496 kobiet i ich partnerzy zakwalifikowani do IVF, a grupa kontrolna obejmowała 385 płodnych kobiet i ich partnerów. Do realizacji postawionych celów doktorantka użyła badań przy zastosowaniu nowoczesnych metod biologii molekularnej i badań w systemie ELISA, wśród których należy wymienić genotypowanie KIR; genotypowanie HLA-C na poziomie grup C1 i C2 i genotypowanie polimorfizmu insercji/delecji w genie HLA-G metodami PCR-SSP, a także genotypowanie SNP w genach HLA-G, ERAP1 i ERAP2 metodami PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR, RT-PCR). Badania RT-PCR HLA-G były potwierdzane w ośrodku Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, co potwierdza wysoką wiarygodność otrzymanych wyników. Metodami ELISA badano stężenia sHLA-G, białka ERAP1 i ERAP2 w osoczu krwi obwodowej i nasieniu. Otrzymane wyniki badań i przedstawione sprawozdania świadczą o umiejętnym postępowaniu z materiałem badawczym i doskonałym opanowaniu przez doktorantkę warsztatu badań molekularnych i białkowych.

W analizie statystycznej zastosowano szereg testów statystycznych, takich jak test Fishera, Chi-kwadrat, t-Studenta, Manna-Whitneya, D'Agostino-Pearsona, Kruskala-Wallis oraz analizę krzywych ROC. Testy te dobierano prawidłowo w zależności od celu analizy statystycznej i właściwości danych. Dodatkowo badano istotność nierównowagi Hardy-Weinberga w genotypach. Oceniono również moc testów statystycznych w zależności od liczebności próby. W każdym porównaniu uwzględniono poprawkę dla porównań wielokrotnych wg. Bonferroniego. Segregację haplotypów generowano metodą populacyjną przy użyciu algorytmu FAMHAP. Opracowanie statystyczne danych uzyskanych w pracy należy uznać za w pełni wiarygodne.

Omówienie wyników jest obszernie, wielowątkowe i zgodne z zakresem przeprowadzonych badań. Przedstawione badania są faktycznie pierwszymi w świecie badaniami o szerokim zakresie analiz dotyczących ERAP w kontekście genów KIR i HLA. W ocenie pracy nie sposób odnieść się szczegółowo do wszystkich wyników otrzymanych przez Doktorantkę i przedstawionych w pracy doktorskiej. Przedstawiam zatem tylko niektóre, moim zdaniem najważniejsze z nich wraz z oceną, a także ogólne odniesienie do ich naukowego i klinicznego znaczenia.

W ocenie związku genów KIR, HLA-C i ERAP u kobiet z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka na czoło wybija się obserwacja iż kombinacja telomerowej części diplotypów KIR AA wraz z genotypem HLA-C C2C2 kobiety jest niekorzystna do zajścia w ciążę. Natomiast diplotyp KIR Tel BB u kobiet w kombinacji z genotypem HLA-C1C2 partnera sprzyjał zajściu w ciążę i skutecznej implantacji zarodka. Co więcej, kombinacja złożona z diplotypu KIR BB (Cen BB/Tel BB) kobiety i HLA-C1C2 partnera wystąpiła wyłącznie w płodnej kontroli, co świadczy o wybitnie korzystnym wpływie tej kombinacji genotypów na płodność pary rodzicielskiej. U kobiet znaczny efekt ochronny przed nieplodnością i nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka (RIF) wykazała kombinacja genotypu GG w miejscu polimorficznym rs26653 ERAP1 z genotypem HLA-C2C2, natomiast kombinacja GC/HLA-C2C2 predysponowała do RIF. Efekt ochronny zaobserwowano również wtedy, gdy kobieta posiadała genotyp ERAP1 rs26653 i była pozytywna pod względem KIR AA natomiast partner był homozygotą pod względem HLA-C2C2. Pomimo kombinacji genotypu KIR AA matki i HLA-C2C2 ojca, która prowadziła do silnego hamowania doczesnowych komórek NK do wydzielania cytokin i czynników wzrostowych niezbędnych do implantacji i rozwoju zarodka, genotyp GG miejscu polimorficznym rs26653 ERAP1 wpływał ochronnie.

Spostrzeżenia te były zgodne z modelem, w którym inwazja doczesnej przez trofoblast zarodka i następująca po niej implantacja są wspomagane przez maciczne komórki NK stanowiące dominujący składnik układu odpornościowego doczesnej w fazie lutealnej i w ciąży. Komórki NK kobiety o diplotypie KIR BB zawierają znacznie więcej aktywujących receptorów KIR niż diplotypy zawierające haplotyp KIR A i mogą skuteczniej promować implantację, pod warunkiem oddziaływania z ligandami HLA-C1 lub HLA-C2 na trofoblaście.

U partnerów kobiet z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka genotyp KIR Cen Bx (BB lub BA) był związany z nieco większym ryzykiem niepowodzeń rozrodu i częstszą niż częstość spodziewana, koniecznością skierowania pary rodzicielskiej do terapii IVF. Doktorantka ma rację przypuszczając, że może dochodzić do aktywacji cytotoksyczności komórek NK w nasieniu. Zależność niepowodzeń implantacji od pełnego diplotypu KIR ojca sugeruje jednak wpływ komórek NK ojca na zaburzenie jakości spermatogenezy w uprzywilejowanym immunologicznie obszarze jądra (transmigracja komórek NK ojca pomimo bariery krew-jądro).

W pracy wykazano, że poszczególne warianty genetyczne aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej ERAP w kombinacjach z HLA-C lub KIR mogą wpływać na zmianę aktywności komórek NK doczesnej w zakresie wspomagania przez te komórki rearanżacji naczyń i arteriogenezy, a także zmianę skuteczności wytwarzania cytokin i czynników wzrostu,

co może powodować zróżnicowanie skuteczności implantacji i rozwoju zarodka. Oprócz mechanizmów wskazanych przez doktorantkę, należy zwrócić uwagę na fakt, że powinowactwo aktywujących receptorów KIR jest zazwyczaj niskie i znacznie bardziej zależne od swoistości peptydów prezentowanych w rowku liganda HLA klasy I, niż powinowactwo hamujących receptorów KIR, których powinowactwo do ligandów HLA jest zwykle wysokie. Zatem funkcja wytwarzania przez komórki NK cytokin i czynników, od których zależy implantacja jest wysoce zależna od repertuaru peptydów dostrajanych przez aminopeptydazy ERAP.

Niektóre haplotypy i diplotypy HLA-G rs1632947G>A - rs1233334G>C/T - rs371194629ins/del były związane z niepłodnością i zaburzeniami implantacji zarodka.

W pracy potwierdzono fakt, że cząsteczki białkowe HLA-G, a zwłaszcza ich rozpuszczalne formy mają istotne miejscowe działanie immunosupresyjne, które działa ochronnie w stosunku do semialogenicznego trofoblastu i zarodka. Obecność sHLA-G w spermie jest korzystna już na najwcześniejszym etapie rozwoju zarodka w czasie i po zapłodnieniu, a zawartość sHLA-G w osoczu kobiety ochrania zarodek i płód w następnych etapach rozwojowych. Mocną stroną pracy jest wykazanie istotnych klinicznie zależności pomiędzy wariantami genetycznymi HLA-G a stężeniem sHLA-G w osoczu i spermie. Udowodniono, że stężenie sHLA-G w osoczu i spermie jest istotnie obniżone w przypadku posiadania przez kobietę lub mężczyznę haplotypu HLA-G G-C-ins lub diplotypu G-C-ins/G-C-ins, co obniża szansę na skuteczne zapłodnienie.

W pracy wykazano, że polimorfizm genów ERAP1 i ERAP2 może brać udział w patogenezie nawracających niepowodzeń implantacji podczas IVF, również w kombinacji z HLA-C. Największy wpływ na niepłodność i RIF (recurrent implantation failure) mają polimorfizmy ERAP1 rs26653 i rs26618 w układzie z allotypem HLA-C2 u kobiet. Być może polimorfizmy te prowadzą do przycinania zmienionego repertuaru peptydów tak, że kompleksy MHC-peptyd są mniej skuteczne w aktywacji doczesnych komórek NK i nie wystarczająco promują implantację. W układzie kobieta/partner ERAP1 kobiety/HLA-C partnera istotną rolę niepowodzeniach implantacji zarodka odgrywają polimorfizmy rs30187 i rs27044. W układzie ERAP partnera i HLA-C kobiety istotne znaczenie wykazano dla polimorfizmu rs30187. Zaobserwowano również związek stężenia wydzielanych białek ERAP1 i ERAP2 z niepłodnością u kobiet. Stwierdzono, że rozpuszczalna forma ERAP2 jest potrzebna do implantacji zarodka, lecz zbyt wysokie stężenie może się przyczynić do poronień. Zatem, za pomocą krzywej ROC wyznaczono stężenie ERAP2, które związane było z wystąpieniem poronienia u pacjentki, co może mieć istotne znaczenie diagnostyczne i kliniczne.

Praca została wykonana starannie pod względem niuansów merytorycznych i językowych, a także wzorowo opracowana w zakresie edytorskim oraz graficznym tabel i rycin. Znalaziono tylko nieliczne niedociągnięcia i drobne błędy. Na przykład, na stronie 167 doktorantka określiła prawdopodobnie ten sam polimorfizm jako rs2287987, a także rs2287986 lub rs2278978, co należy zweryfikować podczas publikacji. Na stronie 178 użyto nieaktualnej nomenklatury alleli HLA-G, którą należałoby przetłumaczyć na wersję obowiązującą po roku 2010. Określenie „ekspresjonować” nie jest przyjęte w słownictwie genetycznym. Proponuję posługiwanie się określeniem „eksponować”, „prezentować”, „wykazywać ekspresję” itp. Na stronie 162 Doktorantka wyraża pogląd, że „... Krzyżowa prezentacja peptydów własnych i tych pochodzących od patogenów przez własne cząsteczki HLA może prowadzić do autoimmunizacji”. Stwierdzenie to należy uzupełnić o informację, że chodzi o własne peptydy nie należące do repertuaru „selfu” immunologicznego. [Uzasadnienie: W stanie zdrowia niemal wszystkie cząsteczki HLA występujące na komórkach organizmu prezentują własne peptydy. Prezentacja peptydów własnych jest podstawową przyczyną pozytywnej selekcji limfocytów T w grasicy i naiwne limfocyty T opuszczające grasycę posiadają TCR o niskim powinowactwie do kompleksów HLA-własny peptyd i na tej zasadzie podlegają toleryzacji w stosunku do „selfu” immunologicznego]. Na stronie 165 autorka stwierdza, że „wariant genetyczny rs26618C znajdujący się na haplocybie ERAP1 ma niską aktywność enzymatyczną...”, gdy tymczasem to produkt białkowy genu posiada aktywność enzymatyczną. Na stronie 169 autorka używa pleonazmu: „... po zapłodnieniu IVF...”, podczas gdy skrót IVF zawiera słowo zapłodnienie. Na stronie 169 autorka zaproponowała hipotezę: „Wtedy nie nastąpi hamowanie komórek NK, co będzie korzystne dla implantacji zarodka”. Należałoby mówić raczej o przesunięciu równowagi aktywacyjnej, niż o całkowitym braku hamowania komórek NK. Na stronie 169 autorka stwierdziła: „... na trofoblaście występują cząsteczki HLA-C2C2 ojca”, podczas gdy na trofoblaście może wystąpić tylko jedno C2 ojca. Na stronie 172, drugi akapit kończy się niedokończonym zdaniem: „Nie zawsze więc”. Należy dokończyć lub usunąć to sformułowanie. Na stronie 185 (i w kilku innych miejscach) użyto określenia „skorelowali”. Należałoby raczej użyć określenia: określili stopień korelacji.

Drobne błędy i niedociągnięcia nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań doktorantka wyciągnęła 4 wnioski w pełni uzasadnione otrzymanymi wynikami i adekwatne do założeń pracy:

1. Nosicielki genów dla receptorów hamujących KIR z regionu telomerycznego AA i HLA-C2C2 są obarczone wyższym ryzykiem niepłodności i nawracających niepowodzeń implantacji zarodka;
2. Mężczyźni posiadający zestaw genów dla receptorów aktywujących KIR (Cen AB lub Cen BB) charakteryzują się większym prawdopodobieństwem niepłodności, co może mieć wpływ na niepłodność pary.
3. Niektóre polimorfizmy pojedynczego nukleotydu ERAP1 i ERAP2 u kobiet HLA-C2 pozytywnych, a także kombinacje ERAP1/HLA-C/KIR w układzie kobieta/partner, mają związek z niepłodnością i RIF. Rozpuszczalna forma ERAP2 mierzona w osoczu kobiet może być wskaźnikiem przewidującym wystąpienie poronienia.
4. Polimorfizmy w regionie promotora oraz 3'UTR genu HLA-G mają związek z niepłodnością zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Najbardziej niekorzystnym haplotypem jest układ G-C-ins (-964G/-725C/+14 pz ins). Polimorfizm genu HLA-G wpływa na wydzielanie rozpuszczalnej formy sHLA-G i powodzenie ciąży. Kobiety po stymulacji jajników protokołem krótkim (z antagonistą GnRH) i w cyklu mrożonym mają większe szanse na powodzenie ciąży.

Doktorantka wykazała ostrożne podejście i krytyczną interpretację własnych wyników, zwłaszcza w przypadku mniejszej liczebności w podgrupach stratyfikacyjnych i w przypadku wyników na granicy istotności statystycznej. Oprócz przedstawionej powyżej wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej, można się pokusić o wskazanie przyszłych kierunków badawczych i praktycznych. Recenzent pragnie zasugerować, że wskazana byłaby dalsza praca nad wartością diagnostyczną i prognostyczną stężeń ERAP2, a zwłaszcza badaniem dynamiki zmian stężenia ERAP2 w zależności od fazy prawidłowo przebiegającej ciąży oraz nad międzylaboratoryjną standaryzacją pomiarów stężenia ERAP2 w osoczu kobiet ciężarnych. Działania te mogłyby uściślić wartość pomiaru stężenia ERAP2 jako czynnika prognostycznego wystąpienia poronienia.

Pracę oceniam jako w pełni oryginalną, dojrzałą rozprawę naukową o bardzo wysokiej wartości merytorycznej, wykonaną osobiście w zakresie badawczym, tekstowym i merytorycznym. Praca spełnia zarówno standardy dobrej praktyki laboratoryjnej i lekarskiej, jak i standardy bioetyczne. Praca spełnia ustawowe wymogi dla rozprawy na stopień doktora.

Przedstawiając pozytywną ocenę pracy wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o

dalsze procedowanie przewodu doktorskiego celem nadania mgr inż. Karolinie Piekarskiej stopnia naukowego doktora.

W związku z wysoką wartością merytoryczną rozprawy doktorskiej, nienaganną formą edytorską oraz faktem publikacji fragmentów pracy w formie pięciu artykułów w recenzowanych czasopismach wnoszę również o uznanie rozprawy za wyróżniającą się i nagrodzenie doktorantki.

Janek Nowak