



## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Piekarskiej

*Rola KIR, ich ligandów HLA-C i HLA-G oraz aminopeptydaz siateczki  
śródpłazmatycznej w nawracających niepowodzeniach implantacji zarodka po  
zapłodnieniu pozaustrojowym*

W krajach wysoko rozwiniętych niepłodność dotyczy 15% par. W Polsce około 1.2 do 1.5 miliona par może mieć zatem problem z posiadaniem potomstwa. W około 75-80% przypadków udaje się zidentyfikować przyczynę niepłodności. W pozostałych 25-20% nie jest ona dokładnie znana i dopiero bardzo szeroka diagnostyka lub wręcz stosowanie metod eksperymentalnych, jeszcze nie walidowanych klinicznie daje wstępny pogląd na temat możliwych czynników patofizjologicznych, ograniczających płodność. Przyjmuje się, że w wypadku niepłodności idiopatycznej (o niej tu mowa) znaczenie mogą mieć niepoznane jeszcze czynniki natury genetycznej, immunologicznej i psychologicznej.

W pewnym sensie, podobna sytuacja istnieje w przypadku niepowodzeń leczenia niepłodności zaawansowanymi metodami rozrodu wspomaganego medycznie. Najbardziej skuteczną metodą terapeutyczną, którą jest zapłodnienie pozaustrojowe (IVF) pomaga zdecydowanej większości pacjentek i pacjentów, jednak istnieje grupa, w której mimo przeprowadzenia wielu transferów zarodków nie udaje się doprowadzić do porodu zdrowego dziecka. Mowa tutaj o nawracających niepowodzeniach IVF, wśród których najwięcej jest nawracających niepowodzeń implantacji (RIF – *recurrent implantation failure*), które w ok. 50% przypadków mają podłoże idiopatyczne. Podobnie jak wyżej, przyjmuje się, że istotne znaczenie mają tutaj czynniki genetyczne (możliwe mutacje i polimorfizmy) i (lub wynikające z nich) funkcjonalne zaburzenia immunologiczne oraz hematologiczne (trombofilia).

Fakt wielokrotnych niepowodzeń IVF jest dla niepłodnych pacjentów bardzo frustrujący. Niestety medycyna kliniczna oparta o dowody naukowe (EBM) nie daje na razie ani pacjentom, ani lekarzom jednoznacznych rekomendacji dotyczących dalszego postępowania. Jest to z jednej strony powodem depresji i rozstań, a z drugiej prowadzi do stosowania niesprawdzonych klinicznie metod diagnostyczno-terapeutycznych.

Jest to też sytuacja unikatowa, wiadomo bowiem z badań podstawowych, że implantacja jest procesem regulowanym immunologicznie przez antygeny zgodności tkankowej (HLA-C i HLA-G), receptory KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*), które pozwalają na ich rozpoznanie oraz komórki NK, na których te receptory się znajdują. Jednak nie ma nadal jednoznacznych badań klinicznych, dotyczących ich znaczenia praktycznego.

Dlatego też, badania poświęcone czynnikom odpowiedzialnym za powodzenie implantacji należy uznać za potrzebne, ciekawe i praktyczne klinicznie. Co więcej, puszczając nieco wodze naukowej fantazji i pozwalając sobie na pewne uogólnienie, można zaproponować hipotezę, że zaburzenia implantacji mogą odpowiadać nie tylko za RIF ale i za na pozór dość odległe problemy kliniczne jak niepłodność idiopatyczna oraz nawracające straty ciąży jawnych klinicznie.

Głównym celem pracy była ocena związku polimorfizmu genów KIR i ich ligandów HLA-C i HLA-G oraz aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2 (*endoplasmic reticulum aminopeptidase*) z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym. Dodatkowo Doktorantka postawiła sobie za cel: 1) zbadanie stężenia aminopeptydaz ERAP1 i ERAP2 w osoczu krwi u kobiet przystępujących do IVF (przed i po procedurze) oraz u kobiet płodnych; 2) zbadanie stężenia rozpuszczalnego sHLA-G w osoczu krwi kobiet przystępujących do IVF oraz kobiet płodnych oraz 3) skorelowanie genotypu HLA-G badanych kobiet ze stężeniem jego rozpuszczalnej formy przed i po IVF. Dodatkowo mgr Karolina Piekarska podjęła próbę oceny roli sHLA-G w męskiej niepłodności, czyli 4) zbadania stężenia sHLA-G w nasieniu partnerów kobiet przystępujących do IVF oraz skorelowania jego stężenia z parametrami nasienia oraz haplotypami HLA-G.

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantów: 1) w latach 2015-2020 - OPUS 7, pt.: „Związek polimorfizmu genów KIR, LILRB oraz ich ligandów – HLA-C i HLA-G z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu in vitro”, (nr projektu: 2014/13/B/NZ5/00273, kierownik prof. Izabela Nowak); oraz 2) w latach 2019-2022 - PRELUDIUM 15, pt.: „Rola aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2 w nawracających niepowodzeniach implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym in vitro u pacjentek o różnym statusie immunologicznym” (nr projektu: 2018/29/N/NZ5/00940), którego kierownikiem była Doktorantka.

We wstępie Doktorantka definiuje pojęcie niepłodności i opisuje metody jej leczenia, skupiając się na technikach wspomaganego rozrodu. W dalszej części odnosi się do skuteczności IVF i nawracających niepowodzeń implantacji, szczegółowo opisując ich etiopatogenezę. Następnie czytelnik ma możliwość zapoznania się z procesem implantacji zarodka i rolą jaką w nim odgrywają maciczne komórki NK oraz limfocyty CD8+ oraz ich właściwą funkcją w kontekście rozpoznawania antygenów zgodności tkankowej za pomocą receptorów immunoglobulinopodobnych KIR. Bardzo szczegółowo opisano warianty polimorficzne genów KIR, ligandy dla KIR czyli głównie HLA-C i HLA-G, a także ich złożone interakcje, których efekty przyzwalające na implantację zarodka mogą być różne w zależności od wariantu polimorficznego. Funkcja ta jest także modulowana przez aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i 2, a występowanie różnych wariantów polimorficznych genów dla tych metaloproteinaz i (lub) stężeń tych enzymów może być dodatkowym czynnikiem modulującym implantację zarodka, zarówno w kontekście modyfikacji interakcji wybranych MHC-I z KIR jak i angiogenezy doczesnowej. W opisie Doktorantka nie pominęła także roli innych cytokin i czynników wzrostu, które mogą mieć znaczenie w regulacji procesu implantacji zarodka.

Rozdział ten jest na tyle ciekawy, aktualny i wyczerpujący, że mógłby stanowić osobną publikację poglądową. Wynikają z niego jasno przedstawione założenia i cele pracy doktorskiej. W tej części pracy moje uwagi dotyczą kwestii klinicznych – braku doprecyzowania omawianych wskaźników skuteczności leczenia metodą IVF - nie wiadomo bowiem czy Doktorantka ma na myśli porody, czy ciąże kliniczne w przeliczeniu na transfer zarodków, punkcję czy wskaźniki kumulatywne. Nie wyodrębniłbym także osobnej procedury ART jaką jest IMSI (MSOME), która w rzeczywistości jest wariantem ICSI. Odradzałbym także stosowania potocznego terminu „bezpłodność” zamiast niepłodność.

Badania przeprowadzono u blisko 500 par, które dysponowały w trakcie leczenia w sumie 1859 przeniesionymi zarodkami, w różnych cyklach leczenia. W grupie tej znajdowało się 283 kobiet z RIF. Niestety nie jest jasne do końca, jakie były kryteria włączenia i wyłączenia z badania, a w szczególności dobór grupy pacjentów bez RIF (skoro spodziewana częstość RIF wynosi ok 10%, to w grupie tej powinno się znajdować znacznie więcej par). W badaniach wykorzystano metody biologii molekularnej RT-PCR, PCR-SSP (typowanie genów KIR, HLA-C, HLA-G i ERAP1, ERAP2) i metody immunoenzymatyczne ELISA (stężenia w osoczu i nasieniu rozpuszczalnej formy HLA-G (sHLA-G), stężenia w osoczu

ERAP1 i ERAP-2). Wyniki te korelowano ze skutecznością rozrodu wspomaganego (grupa badana) i naturalnego (grupa kontrolna). Do porównań, korelacji i predykcji zastosowano poprawnie dobrane testy analizy statystycznej.

Wyniki badań swojej pracy doktorantka opublikowała w 5 artykułach o łącznym IF wynoszącym 29,089 (!). W publikacjach tych Doktorantka była czterokrotnie pierwszym, a jednokrotnie drugim autorem (w 2. publikacji na liście poniżej Doktorantka jest równorzędnym pierwszym autorem).

1) Nowak I, Wilczyńska K, Wilczyński JR, Malinowski A, Radwan P, Radwan M, Kuśnierczyk P. KIR, LILRB and their Ligands' Genes as Potential Biomarkers in Recurrent Implantation Failure. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;65:391.

2) Nowak I, Wilczyńska K, Radwan P, Wiśniewski A, Krasieński R, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Kuśnierczyk P. Association of soluble HLA-G plasma level and HLA-G genetic polymorphism with pregnancy outcome of patients undergoing in vitro fertilization embryo transfer. *Front Immunol*. 2020;10:2982.

3) Wilczyńska K, Radwan P, Krasieński R, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Barcz E, Nowak I. KIR and HLA-C genes in male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37:2007.

4) Piekarska K, Radwan P, Tarnowska A, Wiśniewski A, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Nowak I. ERAP, KIR, and HLA-C profile in recurrent implantation failure. *Front Immunol*. 2021;12:755624.

5) Piekarska K, Radwan P, Tarnowska A, Wiśniewski A, Krasieński R, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Nowak I. The association of HLA-G gene polymorphism and its soluble form with male infertility. *Front Immunol*. 2022;12:791399.

Badania pozwoliły na określenie korzystnych i niekorzystnych polimorfizmów genów KIR, HLA-C, HLA-G, ERAP1 i ERAP2 i ich wzajemnych kombinacji w etiopatogenezie niepłodności. Zostały one bardzo merytorycznie przedstawione, omówione i skonfrontowane z wynikami badań innych autorów (Autorka cytuje aż 376 pozycji aktualnego piśmiennictwa) na ostatnich 30 stronach pracy. Doktorantka wyciągnęła wnioski, że 1) nosicielki genów dla receptorów hamujących KIR regionu telomerycznego AA i HLA-C2C2 są obarczone wyższym ryzykiem niepłodności i nawracających niepowodzeń implantacji zarodka; 2) prawdopodobieństwo niepłodności wzrasta również u mężczyzn z zestawem genów dla receptorów aktywujących KIR regionów centromerycznych AB i BB; 3) związek z niepłodnością mają także inne niektóre SNP ERAP1 i ERAP2 u kobiet HLA-C2 pozytywnych, a także inne konkretne kombinacje ERAP1/HLA-C/KIR w układzie kobieta/partner; 4) pomiary stężeń rozpuszczalnej formy ERAP2 w osoczu kobiet mogą być predyktorem zagrażającego poronienia; oraz 5) niektóre polimorfizmy genu HLA-G mogą mieć również związek z niepłodnością zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn, ponieważ wpływają na wydzielanie rozpuszczalnej formy sHLA-G i powodzenie ciąży. Okazało się także, że pacjentki po kontrolowanej hiperstymulacji jajników antagonistą GnRH i po transferze zarodków przechowywanych (tzw.

"mrożonych") mają większe szanse na powodzenie ciąży niż przy innych schematach stymulacji lub przygotowania do transferu zarodków.

Świetnym pomysłem okazało się przedstawienie najważniejszych i najbardziej praktycznych wniosków wynikających z pracy w postaci bardzo czytelnych i dydaktycznych rycin (55 i 56).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska to gigantyczna i solidna praca, zasługująca na wyrazy najwyższego uznania. Gratulacje należą się nie tylko Doktorantce, ale i Promotorce, profesor Izabeli Nowak. O wartości merytorycznej niech świadczy nie tylko olbrzymi dorobek w postaci publikacji (co jest podstawą do jej wyróżnienia), ale i zmiana mojego (do czasu lektury tej pracy) dość sceptycznego podejścia do zagadnienia tzw. niepłodności immunologicznej.

Z perspektywy specjalisty medycyny rozrodu, ale i embriologii klinicznej muszę podkreślić, że badania nad zaburzeniami implantacji są szczególnie skomplikowane, ponieważ, w praktyce dotyczą okresu, który jest „niemy” klinicznie - nie ma bowiem jeszcze narzędzi oceny prawidłowości bardzo wczesnego rozwoju zarodkowego i wczesnych etapów implantacji. Sprawę dodatkowo komplikuje fakt, że zmiany endometrium oraz zarodka wynikające z różnej ekspresji genów są funkcją czasu, co ogranicza możliwość badania markerów prawidłowej implantacji.

Oceniana rozprawa ma walory wyjątkowo wartościowej pracy naukowo-badawczej i spełnia wymogi stawiane pracy doktorskiej. Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Piekarskiej do dalszej części przewodu doktorskiego i wyróżnienie jej pracy doktorskiej.



Szczecin 10 czerwca, 2022 roku

prof. dr hab. med. Rafał Kurzawa

