



Ocena

Dorobku naukowego dr n. med. Moniki Kniotek oraz osiągnięcia naukowego pt. Określenie mechanizmu immunomodulacyjnego działania cytrynianu sydenafilu (S.C.) na układ immunologiczny kobiet z niewyjaśnionymi nawracającymi poronieniami (unexplained Recurrent Pregnancy Loss, uRPL). Określenie różnic w odpowiedzi immunologicznej pacjentek z uRPL, kobietami ciężarnymi oraz wieloródkami". Osiągnięcie jest przedmiotem Wniosku Kandydatki o ubieganie się na stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplina – nauki medyczne.

Nie posiadam danych biograficznych Kandydatki poza jej Autoreferatem – wnioskuję z pierwszego Jej tytułu, magistra biologii, że ukończyła studia właśnie w zakresie biologii i tytuł magistra biologii jest zarazem świadectwem ukończenia studiów w tym zakresie (w roku 2001). Jednocześnie w tym samym roku Kandydatka zostaje pracownikiem naukowo-technicznym Zakładu Immunologii Klinicznej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) i zdaje egzamin kwalifikujący ją na Inspektora Ochrony Radiologicznej przez Państwową Agencję Atomistyki (PAA). Równolegle rozwija drogę zawodową diagnosty laboratoryjnego w wyniku uzyskania prawa wykonywania zawodu diagnosty w roku 2005 poprzez weryfikację Krajowej Izby Diagnostów laboratoryjnych. W tym zawodzie pozostaje aktywna, i jak się domyślam jej równoległe zatrudnienie (w latach 2001-2020) w Szpitalu Klinicznym Dzieciątka Jezus, Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego WUM, nie oznacza zakończenia działalności w ramach uzyskanego uprawnienia. Natomiast główna kariera Kandydatki pozostaje w zakresie kolejno zdobywanych stanowisk w Zakładzie Immunologii WUM, w charakterze asystenta (2010-2021), a następnie adiunkta, od roku 2021.

Dorobek naukowy kandydatki obejmuje m.in. 7 publikacji składających się na Osiągnięcie, przy czym wszystkie one znajdują się na liście JCR (Journal Citation Reports - JCR). Ogółem opublikowała 37 prac (czasami mówi się o 38 ale brak upewniającej te dane dokumentacji). Publikacji w czasopiśmie ewidencjonowanych na liście z JCR Kandydatka sprawozdaje 19, zaś posiadających współczynnik oddziaływania IF (IF = impact factor) – 33 (z czego przed uzyskaniem stopnia doktora – 11. Osobiście uważam, że liczba publikacji w czasopiśmie z listy JCR jest większa niż 19, albowiem nie wzięto pod uwagę 10 publikacji wynikającej z działalności przed uzyskaniem stopnia doktora (tak to, dosyć dziwnie sama zainteresowana podzieliła). A w tych publikacjach są także czasopisma z listy JCR. Natomiast ze spisu publikacji Kandydatki wynika, że publikacji ze współczynnikiem oddziaływania jest 30, albowiem 3 z nich są powtórzone (jedna praca pogładowa, opis przypadku i praca suplementowa – a jedna pogładowa nie została ujęta w spisie głównym Kandydatki). Zaś w spisie bibliotecznym widnieją 3 prace, które nie figurują w ogóle w spisach uczynionych przez Kandydatkę, tj. z *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2017, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2018 oraz *Medical Hypotheses*, 2022. Łącznie 33 publikacje z IF – prawda jaki to piękny bałagan?! Co jednak przemawia na niekorzyść Kandydatki jest ona zaledwie w 6 publikacjach pierwszym autorem, a w jednej ostatnim. Ogólne dane bibliometryczne podane przez Kandydatkę w Autoreferacie opiewają na skumulowany IF – 104,59, (tego współczynnika już nie sprawdzałem) przy liczbie cytowań w zakresie od 750 do ponad 800 w

zależności od Bazy Danych oraz indeksie Hirscha wynoszącym – 13. Zarówno dane bibliometryczne dorobku ogólnego, jak i dotyczącego Osiągnięcia stawiają Kandydatkę w dobrym świetle.

Dorobek kandydatki skoncentrowany jest w dużej mierze na niepłodności, niepowodzeniach rozrodu oraz niektórych zastosowaniach terapeutycznych w czym dopomaga długookresowa współpraca z prof. Małgorzatą Jerzak z Wojskowego Instytutu Medycznego (Państwowy Instytut Badawczy – WUM-PIB), pod której opieką realizowała prace doktorską pt. „Wpływ cytrynianu sildenafilu na aktywność komórek NK krwi obwodowej kobiet z nawracającymi poronieniami” – w wyniku obrony której nadano jej tytuł doktora nauk medycznych przez Radę Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w roku 2013.

Bardziej szczegółowo ustosunkowując się do dorobku Kandydatki chciałbym podkreślić Jej udział w badaniach związanych z zastosowaniem cytrynianu syldenafilu, które przez długi czas były (i być może będą) przedmiotem Jej zainteresowania, leku wielokierunkowego i o nadal jeszcze nierozpoznanym oddziaływaniu, przez co wpływ tego leku na zjawiska immunologiczne jest ważnym przyczynkiem do zrozumienia modułów terapeutycznych i indywidualizacji leczenia.

Dorobek Kandydatki zawiera się w kilku nurtach badawczych – jeden z nich, dosyć istotny opiewa na współpracę z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu (Laboratorium Bakteriofagowe – prof. Andrzej Górski) w zakresie zastosowania bakteriofagów oraz ich interakcjami z układem immunologicznym. W tej tematyce Kandydatka opublikowała (jako współautor) 4 prace o rozmaitych współczynnikach oddziaływania (IF), tj. od 0,58 aż do 8,2 (*Clin Infect Dis.*, 2023) – przy czym ta ostatnia publikacja ma charakter suplementowy, przeto nie można jej przydawać IF z regularnego toku wydawniczego. Może jednak warto przyrzeć się dwóm wydawnictwom bez współczynnika oddziaływania, w których dr Kniotek jest autorem pierwszym. W pierwszej z omawianych publikacji (Wydawnictwo Medimond – *Phages as Immunomodulators of Antibody Production*, 2004) wówczas jeszcze jako doktorantka, dr Kniotek zaobserwowała iż fagi *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas* hamowały produkcję przeciwciał typu IgG *in vitro* (hodowle jednojądrzastych komórek krwi obwodowej), natomiast podawanie bakteriofagów *Staphylococcus aureus* pacjentom z przewlekłym zapaleniem kości powodowało *in vivo* wzrost poziomu przeciwciał. Mogło to prowadzić do dalszego zainteresowania fagami, które w pewnych warunkach mogą pełnić rolę modulatora odpowiedzi humoralnej. Druga publikacja, której dr Kniotek była pierwszym autorem (Monduzzi Editore, 2004 – *Bacteriophage Interactions with T cells and Platelets*) ,moim zdaniem bardziej kontrowersyjna, donosi, że motyw lizyno-glicyno-aspragainowy może oddziaływać z integralną AlfallBeta występującą obficie na płytkach krwi (autorzy wnoszą, że blokowanie tej integraliny na płytkach krwi może blokować reakcje z fibrynogenem przez co może hamować ich agregację). Analogiczna sytuacja z blokowaniem integraliny na aktywowanych limfocytach T przez bakteriofagi może nie być wcale (moim zdaniem) pożytecznym procesem. Rola bakteriofagów w środowisku autoimmunologicznym pozostaje zatem pewną kontrowersją ponieważ nie wiemy w którym kierunku ta odpowiedź immunologiczna byłaby kierowana. Publikacja suplementowa w *Clin Infect Dis* jak wynika z dalszego jej opisu w Autoreferacie



była raczej pracą poglądową, zwracającą uwagę na praktyczne wykorzystanie bakteriofagów w rozlicznych stanach infekcyjnych i zapalnych. W innej pracy opublikowanej (Kandydatka pozycjonuje się wśród innych współautorów) w *Adv Virus Res*, 2012 (IF = 2,8) Kandydatka m.in. zaobserwowała u pacjentów leczonych preparatami bakteriofagowymi wzrost odsetka osób ze znormalizowaną aktywnością cytotoksyczną komórek NK.

Jednak najbardziej dojrzałe uprawianą działalnością naukową Kandydatki są aspekty niepłodnościowe, zwłaszcza te wiążące się z utratą ciąży oraz wyniki eksperymentalnych terapii z użyciem cytrynianu syldenafilu oraz tzw. terapii biologicznej. W tym aspekcie wyróżniłbym zwłaszcza publikację z *Fertility Sterility*, 2007 (IF=4,1). Pomijając prestiżowość tego akurat czasopisma branżowego znajdujemy tam dane wskazujące na obniżenie aktywności komórek odpowiedzi wrodzonej, tzw. *natural killer*, NK pod wpływem zastosowanego cytrynianu syldenafilu, co w ogóle dotąd nie było brane pod uwagę, stosując ten preparat. Inną cenną lekcją terapeutyczną (z zaangażowaniem Kandydatki) było łączne zastosowanie etanerceptu (w Polsce najczęściej pod nazwą preparatu handlowego Enbrel), syldenafilu oraz niskocząsteczkowej heparyny. To jednak na dłuższą metę niewiele wnosi, albowiem właściwa dla tej terapii grupa docelowa nie została rozpoznana, a publikację (w *Amer J Reprod Immunol*, 2010, IF= 2,4) należy traktować jako opis specyficznego przypadku medycznego. W tym aspekcie należy zwrócić uwagę, że etanercept nie jest uniwersalnym narzędziem do obniżania poziomu TNF alfa i czasami po prostu zawodzi. Poza tym bardzo zbliżone do Osiągnięcia są stosunkowo wysoko impaktowane publikacje (a wydają się być one tematycznie zbliżone). Na przykład publikowana w 2021 roku praca (*Differences in immune checkpoints expression (TIM3 and PD-1) on T cells in women with recurrent miscarriages*, *J Clin Med.*, IF=4,9), w której co prawda Kandydatka jest autorem trzecim, zaś wyniki częściowo się pokrywają z publikacją nr 7 Osiągnięcia (*Surface immune checkpoints as potential biomarkers in physiological pregnancy and recurrent pregnancy loss*, *IJMS*, 2024) w zakresie ekspresji czynników PD-1 oraz TIM-3. Inna publikacja o modulacji punktów kontrolnych układu odpornościowego przez hormony płciowe być może ukazała się za późno aby włączyć ją do osiągnięcia głównego – nie jest ona także omawiana w Autoreferacie (*Sex hormones-mediated modulation of immune checkpoints in Pregnancy and Recurrent Nancycancy Loss*, *IJMS*, 2026, IF = 5,6). Z ciekawością sięgnąłem po artykuł opublikowany w *J Immunol Res*, 2019, IF=3,3, zatytułowany *Sildenafil citrate influences production of TNF alfa in healthy men lymphocytes* – wynika z niego, że zawiesiny komórkowe stymulowane estrami forbolu (a estry forbolu pobudzają zarówno limfocyty T jak i B, neutrofile, monocyty/makrofagi) poddają się (pod wpływem cytrynianu syldenafilu) znamiennej obniżeniu produkcji TNF alfa, co nie ma miejsca w przypadku przeważającej części limfocytów T odpowiadających na PHA. Oczywiście, tak szerokie spektrum komórek poddających się aktywacji w przypadku estrów forbolu jest bliższe sytuacji *in vivo* niż aktywacja przy pomocy PHA, tylko, że w sytuacji diagnostycznej, zwykle w laboratoriach używa się PHA, a nie estry forbolu. Jak więc obserwować wartości referencyjne aktywacji obwodowych komórek jednojądrzastych (skoro ich w zasadzie nie ma), zaś posiadamy wartości referencyjne w przypadku PHA (może mylące). Piszę to w pewnym zakłopotaniu albowiem to badanie pozostawia niedomknięte pytanie jakie powinno być właściwe



laboratoryjne monitorowanie pacjentów w aspekcie Th1/Th2 – dla właściwego leczenia zarówno biologicznego jak i z użyciem cytrynianu syldenaflu.

Pozostając w aspekcie diagnostycznym dorobku Kandydatki, jedną z nielicznych pozycji w której pełni ona rolę lidera grupy jest publikacja z *Centr Eur J Immunol*, 2024, IF= 1,6 dotycząca immunofenotypowania morfotycznych elementów układu odpornościowego u osób z populacji polskiej, z podziałem na płeć. Moją jedyną wątpliwością co do ogólnopolskiego (być może także międzynarodowego) oddziaływania tej pracy jest fakt, że wartości referencyjne dot. immunofenotypowania w Polsce działają od ponad 2 dekad. Spośród tych wyników, opublikowanych przez Kandydatkę i wsp., niektóre, moim zdaniem, powinny być wzięte pod uwagę w diagnostycznym immunofenotypowaniu – zwłaszcza istotne statystycznie przewyższenie odsetka limfocytów CD45+ u kobiet (CD45 jest uniwersalną strukturą dla wszystkich leukocytów w postaci fosfatazy tyrozynowej regulującej aktywację komórek) no i limfocytów CD21low (również u kobiet) wskazujących na stan przewlekłego obciążenia układ immunologicznego. Te komórki często określane jako „atypowe” lub „wyczerpane” wzrastają również z wiekiem (element starzenia układu immunologicznego). Innym interesującym elementem jest istotny wzrost odsetków oraz liczby absolutnej komórek CD4+CD8+ czy NKT (wraz z wiekiem) przy negatywnych korelacjach (wiekowych) dla limfocytów CD3+CD4-CD8-. Co jest interesujące (i dziwne zarazem), osobnicy męscy, wg tych badań, wykazywali podwyższone odsetki naiwnych limfocytów B, limfocytów B przejściowych oraz plazmablastów (przy jak wiemy upośledzonej względem kobiet odpowiedzi humoralnej). Te krótkie doniesienie jest moim zdaniem interesującym przyczynkiem do ustalenia referencji zwłaszcza dla poszczególnych grup wiekowych.

Z poczucia obowiązku należy wspomnieć o dwóch publikacjach ze stosunkowo wysokim współczynnikiem oddziaływania, w których dr Kniotek znajduje się wśród współautorów. Są to artykuły opublikowane w *Biomolecules*, 2021 (IF 6,0) na temat wpływu immunomodulacyjnego selenowanych polisacharydów (głównie badane komórki NK) oraz w *Pharmaceutics*, 2021 (IF = 6,5), w której oceniano porównawczo interakcję dwóch różnych podtypów mezenchymalnych komórek macierzystych, pochodzenia szpikowego oraz z pępowinowej galarety Whartona z makrofagami ludzkimi różnicowanymi z monocytów krwi obwodowej. Obydwie publikacje pochodzą z dwóch odrębnych projektów badawczych, w których dr Kniotek brała udział jako Wykonawca. Obie publikacje pochodzą też z grupy wydawniczej MDPI, której krótko mówiąc nie jestem fanem (wydawnictwo „drapieżne” o ograniczonej selektywności i wadze recenzowania).

Istnieją też na szczęście wartościowe publikacje, w których dr Kniotek brała udział zarówno w sensie eksperymentalnym jak i współautor nie należące do wydawnictw „drapieżnych”. Spośród nich warto wymienić doniesienie o poziomach hormonu AMH z polimorfizmem receptora dla witaminy D (kobiety z zespołem policystycznych jajników) – publikacja w skądinąd prestiżowym wydawanym przez Springer *J Assist Reprod Genet*, 2019 (IF = 2,8) oraz poziomu progranuliny we krwi u pacjentów z artropatią na podłożu hemofilii (*Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, IF=2,5; wydawnictwo Wiley, publikacje z zakresu psychiatrycznego – *Psychiatry Res*, 2024, IF=3,9; wydawnictwo Elsevier. Praca eksperymentalna kandydatki

zaowocowała też publikacją w wysoko notowanym piśmie *Brit J Cancer*, 2018, IF = 5,4 – wydawnictwo Springer Nature (z zakresu nowotworów piersi) oraz mniej wartościowe obserwacje u pacjentów z cukrzycą typu 2-giego tudzież rakiem okrężnicy. Ten ogólny dorobek kandydatki notuję jako bez wątpliwości argument pozytywny dla Wnioskodawczyni.

Trochę inna sytuacja, i nie ukrywam bardziej kontrowersyjna, dotyczy oceny przedstawionego Osiągnięcia. Otóż – po pierwsze trzon Osiągnięcia stanowi cykl artykułów (zgoda, że poświęcony w większości wpływowi cytrynianu syldenafile na układ immunologiczny oraz skoncentrowany na niepowodzeniach rozrodu) opublikowanych w Wydawnictwie MDPI, które przykładowo małą wagę do wartości merytorycznych, a cykl recenzowania w zasadzie jest na tyle liberalny, aby nie szkodził polityce finansowej wydawanych pism (aż 4 spośród przedstawionych 7 publikacji to publikacje w *J Clin Med* oraz *IJMS*, pozostałe 2 – należą do podobnie operującego Wydawnictwa Hindawi, jedna zaś w *Ginekol Pol* – dosyć nisko impaktowanym piśmie branżowym). To stawia oceniany cykl publikacji w niezbyt korzystnym świetle, dodatkowo w Autoreferencie (Sekcja 4.2.1) źle są podsumowane zbiorcze wskaźniki oddziaływania (powinno być w sumie 27,79 zamiast 26,95 – w tym bez pracy poglądowej – sumaryczny IF = 22,89 zamiast 17,5).

Przechodząc do warstwy merytorycznej, pierwsza z prac cyklu uznana jest za pracę poglądową (*J Immunol Res*, 2017, IF=4,9). Niemniej, pomijając punkty współczynnika oddziaływania (a jest to wspomniane Wydawnictwo Hindawi) ta praca jest dosyć słaba, albowiem być może w roku 2017 nie wiedzano jeszcze na tyle dużo o oddziaływaniach immunologicznych cytrynianu syldenafile. Mieszane zwłaszcza uczucia, budzi fakt, że w jednej sytuacji klinicznej syldenafil miał tendencję do podwyższania poziomu TNF alfa, zaś w innej do jego obniżania (i właściwie nie wiadomo dlaczego?). Syldenafil obniżał aktywność komórek NK, acz okazjonalnie działał terapeutycznie na nowotwory, co jest trudne do uznania ponieważ jego promocja unaczynienia raczej czyni go ryzykownym lekiem w sytuacji nowotworzenia – ok jeśli odbywało się to za pośrednictwem podwyższenia aktywności komórek Treg – tu być może jest coś na rzeczy.

Druga praca z cyklu Osiągnięcia (*Ginekol Pol*, 2015, IF=0,69) jest po prostu kiepska i kontrowersyjna. Okazuje się z niej, że cytrynian syldenafile powodował wzrost poziomu TNF alfa u kobiet z nawracającym poronieniami, zaś etanercept zgodnie z oczekiwaniami obniżał. W obu przypadkach, poziomy te były niekompatybilne z poziomem TNF alfa występującym u kobiet o prawidłowej charakterystyce położniczej. Jednocześnie autorzy tego artykułu (Kandydatka jest pierwszym autorem tej publikacji) próbują wytłumaczyć, że poziomy osiągnięte po interwencji cytrynianem syldenafile, pomimo potencjalnie niekorzystnego efektu (wzmacniającego sekrecję TNF alfa) były podobne do poziomów osiągniętych przez etanercept, co nie jest prawdą, jak wynika z przedstawionej dokumentacji badawczej. Być może po prostu cytrynian syldenafile doprowadził do korzystnych efektów poprzez ograniczenie aktywności komórek NK i pobudzenie komórek T reg – nie zaś poprzez regulację samego TNF alfa. Dalszych dowodów w tej pracy – brak.

Trzecia publikacja z cyklu Osiągnięcia (*Biomed Res Int*, 2021, IF=2,46, Wydawnictwo Hindawi) również niewiele wnosi do tematu. Cytrynian syldenafile oczywiście jest głównym testowanym czynnikiem mającym wpływać na poziom ekspresji receptorów hamujących na



komórkach NK (KIR2DL1 – *ang.* killer inhibitory receptor) KIRNKG2A oraz ILT (*ang.* human inhibitory receptor Ig-like transcript) (ma to być pośrednim dowodem na wpływ na aktywność komórek NK). W innej płaszczyźnie badanie obejmuje także wydzielanie podstawowego czynnika pro-angiogenego – VEGF-A oraz wpływ na apoptozę/nekrozę indukowanych doczesnowych komórek NK. Po pierwsze nie wiem czy separowane z krwi obwodowej pozytywne dla CD56 komórki można pod wpływem opisanej hodowli *in vitro* nazywać indukowanymi komórkami doczesnowymi (skoro nie pochodzą z doczesnej). Układ modelowy, w moim pojęciu, jawi się jako wątpliwy, a także uzyskane wyniki są mało przekonujące. Ale przejdźmy do roli cytrynianu syldenafile, a więc podwyższał on poziom ekspresji KIR2DL1 u kobiet roniących (ale nieistotnie statystycznie) i jednocześnie był nadal niższy niż w grupie kobiet z grupy kontrolnej. W przypadku ekspresji receptora NKG2A – cytrynian syldenafile nie miał żadnego istotnego wpływu w grupie kontrolnej, natomiast powodował istotny wzrost w grupie kobiet roniących, ale ponad wartości obserwowane w grupie kobiet kontrolnych. Zatem nie wiadomo czy jest to zjawisko korzystne. Dla receptora hamującego ILT-2 – cytrynian syldenafile raczej obniżał poziom ekspresji tego receptora w obu badanych grupach. Co bardzo kontrowersyjne – to badanie ko-ekspresji NKG2A/KIR2DL1, gdyż moim zdaniem obserwowany wzrost ko-ekspresji wprowadza zasadniczy zamęt w interpretacji, ponieważ cytrynian klomifenu utrzymywał, a w zasadzie podwyższał niekorzystny (wnioskując co do wartości uzyskanych w stosunku do grupy kontrolnej) hiper ko-ekspresję tych receptorów. Można zatem odnieść wrażenie, że stosowany cytrynian syldenafile (w badanych grupach kobiet) zachowuje się ambiwalentnie (wobec ekspresji receptorów hamujących) co widać na przykładzie receptora ILT-2 – gdzie w obu badanych grupach kobiet obniżał on ekspresję (ale nie statystycznie znamienne) zaś w grupie kobiet roniących podwyższał ekspresję KIR2DL1 oraz NKG2A- ale również nie w sposób statystycznie istotny, dla każdej z badanych grup. Zatem w interpretacji działania cytrynianu syldenafile wobec jego aktywności ocenianej poprzez ekspresję receptorów hamujących – w niczym on zasadniczo, w moim odczuciu, nie pomaga! Niestety ten sam problem dotyczy poziomu wydzielanego VEGF – zastosowany cytrynian syldenafile raczej obniża poziom sekrecji tego czynnika. Nie widać też korzystnego oddziaływania cytrynianu syldenafile w odniesieniu do obserwowanej apoptozy/nekrozy komórek idNK, poza faktem, że u kobiet roniących komórki tzw. idNK są bardziej podatne na nekrozę. W sumie odnoszę wrażenie, że proponowany układ modelowy po prostu nie sprawdził się.

Następna praca cyklu Osiągnięcia (*J Clin Med.*, 2021, IF=4,96) nie jest również wolna od kontrowersji. Przede wszystkim założeniem głównej osi działania cytrynianu syldenafile jest fakt, że poprzez kompetycję miejsca wiążącego fosfodiesterazy 5 do GMP zapobiega on rozkładowi GMP, co powoduje jego utrzymywanie się w wysokim stężeniu, w wyniku czego uzyskujemy lokalnie wysokie poziomy NO prowadzące do relaksacji naczyniowej mięśniówki gładkiej i rozszerzenia naczyń; w języku popularno naukowym uzyskuje się przez to lepsze ukrwienie np. w doczesnej, prąciu itd. Zatem obniżanie aktywności fosfodiesterazy (czy powstawania jej transkryptu) powoduje korzystną reakcję fizjologiczną (wzrost ukrwienia). Obserwując wyniki zebrane na Ryc 1 i 2 tej pracy odnajdujemy dane wskazujące na obniżenie poziomu (transkryptów dla) fosfodiesterazy po założonej kuracji cytrynianem syldenafile, jednak wg Ryciny 2A u kobiet zagrożonych ciążą ten poziom nie spada do wartości



obserwowanych w grupie kontrolnej. Zatem efekt jest taki sobie. To samo dzieje się z czynnikiem pro-angiogennym VEGF-A, kompensacyjnie podwyższonym u kobiet z nawracającymi poronieniami, tzn. nie normalizuje się. Zatem opisywany „efekt normalizujący” syldenafile jest raczej słaby i nie znajduje odniesienia w stosunku do transkrypcji genów dla białka wiążącego reninę (RENBP) łożyskowego czynnika wzrostu (PIGF) czy IL-8. Z kolei analizując supernatanty z hodowli *in vitro*, sekrecja VEGF-A jest nadal w komórkach idNK od kobiet roniących wygórowana i zostaje obniżona (ale nie statystycznie istotnie) po działaniu syldenafile, zaś łożyskowy czynnik wzrostu lekko wzrasta i normalizuje się po podaniu cytrynianu syldenafile – i to jest właściwie wszystko – pozostałe analizowane czynniki pozostają bez zmian. Podwyższenie sekrecji IL-8 (aczkolwiek nieistotne) po podaniu cytrynianu syldenafile pozostaje ambiwalentnym mieczem. Niewątpliwie stosowanie cytrynianu syldenafile ma swoje ograniczenia, które warto znać i umiejętnie stosować wg charakterystyki obranej grupy interwencyjnej – i z tym zdaje się jest największy kłopot.

Jednak najbardziej kontrowersyjnie jawi się według mnie artykuł z cyklu Osiągnięcia opublikowany w *J Clin Med*, 2021, IF=4,9, pt. *Decreased production of TNF alpha and IL-6 inflammatory cytokines in non-pregnant idiopathic RPL women. Immunomodulatory effect sildenafil citrate on the cellular response of idiopathic RPL women*. Najbardziej zagadkowa (a dla mnie szokująca) jest sama grupa kobiet z nawracającymi poronieniami o obniżonym profilu wydzielania cytokin TNF alfa/IL-6. Oczywiście takie grupy mogą zaistnieć np. poprzez nakładanie się alleli u potencjalnych rodziców bez efektu na wydzielanie przez nich cytokin o wspomnianym profilu, jednak przyglądając się bliżej tej grupie jeśli 11 z 22 zrekrutowanych kobiet z nawracającymi poronieniami miało zespół policystycznych jajników (PCOS), to wątpliwości raczej się pogłębiają, ponieważ kobiety z PCOS zwykle manifestują podwyższone poziomy cytokin. Poziom TGF beta był, (prawdopodobnie kompensacyjnie) podwyższony w badanej grupie kobiet roniących. Ku mojemu zdziwieniu nie oznaczano w tej pracy IFN gamma, kluczowego dla prawidłowej interpretacji obrazu Th1/Th2. (Ta grupa kobiet roniących miała jednak podwyższone odsetki komórek NKT). Mutacje czy polimorfizmy w genie *MTHFR* (dla reduktazy metylenotetrahydrofolianowej) są tu raczej drugorzędne. Zatem trudno, moim zdaniem, jest weryfikować faktyczny sposób oddziaływania cytrynianu syldenafile w tak dziwnie wyselekcjonowanej grupie. W odróżnieniu od twierdzenia autorów zastosowanie cytrynianu syldenafile, aczkolwiek w sposób statystycznie istotny zwiększało poziom TNF alfa, nie normalizowało go względem grupy kontrolnej. To samo można odnieść w stosunku do poziomów cytokiny IL-6. Stosowanie cytrynianu syldenafile podwyższało poziom TGF beta oznaczany w supernatantach komórek od płodnych kobiet z grupy kontrolnej i nie miało istotnego efektu w przypadku kobiet z grupy roniącej, jakkolwiek podnosiło istotnie poziom IL-10 w grupie kobiet roniących. Teraz najbardziej frapującym pytaniem jest czy obserwowany profil wydzielania cytokin miał jakkolwiek związek z oznaczanymi odsetkami populacji komórek typu „helper”, komórek typu Treg, czy aktywowanych Th17 lub też o fenotypie Th17/Treg. I tu mamy pewną niespodziankę wynikającą z odczytu Tabeli 2. W odróżnieniu od interpretacji autorów, że cytrynian syldenafile nie oddziałował istotnie na żadną z oznaczanych subpopulacji komórkowych, ja wyraźnie widzę, że odsetek komórek Treg/Th17 wzrastał u kobiet roniących po podaniu cytrynianu syldenafile ($P=0.018$). Pytanie tylko czy to był efekt korzystny?! To pytanie



pozostawiam do wyjaśnienia habilitantce. Nie rozumiem też dlaczego autorzy tej pracy sugerują, że podwyższone poziomy TGF beta miałyby szkodzić ciąży w I-szym trymestrze? Na jakiej drodze? (Czy jest na to dowód czy raczej spekulacja?). Następnym pytaniem, które się rodzi, to czy używanie do badań komórek w 6 miesięcy po ostatnim poronieniu ma faktyczny sens? I czy bodziec je wywołujący nie uległ w międzyczasie normalizacji? Czy habilitantka ma jakiegokolwiek dane w tym względzie? Obawiam się, że selekcja tej grupy kobiet z nawracającymi poronieniami miała bardzo ograniczony sens dla jakiegokolwiek wnioskowania. W dyskusji można także znaleźć wiele sprzeczności w stosunku do „wyprodukowanych danych”, albowiem nie jest tematem tych badań oddziaływanie cytrynianu syldenafilu w grupie kobiet zdrowych, ale wobec ewentualnej korekcji wydzielania cytokin w grupie kobiet roniących z podwyższonym poziomem komórek NKT. Przedstawione spekulacje w sekcji „Conclusions” są, moim zdaniem, zbyt daleko idące i nie mają pokrycia w uzyskanych wynikach.

Następna praca z cyklu Osiągnięcie jest poświęcona tzw. punktom kontrolnym uważanym przez autorów jako potencjalne biomarkery (o znaczeniu prognostycznym?) u kobiet z nawracającymi poronieniami (*IJMS*, 2023, IF=4,91). Habilitantka jest przedostatnim autorem, ale dzierży funkcję autora korespondencyjnego. Jest to bardzo dziwna kombinacja, albowiem odpowiedzialność za artykuł i tak jest rolą autora senioralnego (ostatniego), natomiast autorstwo korespondencyjne chyba wynika z faktu, że Kandydatka była Kierownikiem jednoosobowego Projektu naukowego. Jest to bardzo zachwiana logika, jednak promowana ostatnio przez NCN. W sumie nie wiadomo kto za co odpowiada – odpowiedzialność jest rozmyta i nie wiadomo kto jest prawdziwym „generałem”. a kto tzw. „przyszywanym”. Praca nie bardzo mi się podoba. Ostatnio nadużywa się w immunologii pojęcia „punkty kontrolne”, co do których tak naprawdę nie wiemy (jak i sami ich autorzy) co tak naprawdę znaczą. W uruchomieniu lub zahamowaniu funkcji poszczególnych subpopulacji komórek układu odpornościowego zwykle bierze udział kilka formacji receptorowo-ligandowych. Określanie tzw. rozpuszczalnych form receptorowych powstających w wyniku alternatywnego składania lub trawienia enzymatycznego jako punkty kontrolne jest oczywistą przesadą – prowadzi to do humorystycznych określeń typu „soluble immune checkpoints”. To już lepiej nazywać je potencjalnymi biomarkerami, jednak droga do prawdziwych biomarkerów jest stąd daleka – i nie ma statystycznej hierarchizacji ich wagi – więc będą jedynie „preliminary” potencjalnymi markerami. Są także błędy formalne. Na przykład na rycinie 7 niewątpliwie mamy przedstawioną rozpuszczalną formę Galektyny – jednak na samej rycinie widnieje „Galectin-9”, co sugeruje inną jej formę. Do badania zakwalifikowano 3 grupy – zdrowych i płodnych kobiet nie będących w ciąży, kobiety ciężarne oraz kobiety z nawracającymi poronieniami – oznacza to ekstrapolację wyników w stosunku do dwóch grup kontrolnych, co powoduje pewne zamieszanie – ponieważ w pewnych przypadkach autorzy sami nie wiedzą, która grupa kontrolna winna być prawidłową grupą odniesienia. Przykłady to: sCD86 – wśród kobiet roniących są wyższe niż u kobiet ciężarnych, a z kolei niższe niż w grupie u zdrowych płodnych kobiet. Ta sama sytuacja powtarza się dla biomarkera sCD80. W odniesieniu do SPD-L2 jest z kolei inna sytuacja – poziomy u kobiet roniących są niższe niż u kobiet w ciąży, ale wyższe niż u zdrowych płodnych kobiet. Żeby sytuacja była jeszcze bardziej skomplikowana zarówno sCD86 jak i



sPD-1 lub sPD-L1 oraz sPD-L2 nie wyrażają żadnych znamiennych różnic (pomiędzy badanymi grupami), przeto spekulacje o hamowaniu aktywowanych limfocytów T nie mają według mnie żadnego sensu. Zwracam też uwagę, że ko-receptory pomiędzy komórkami APC a limfocytami typu CTLA-4 są ze swojej natury hamujące tak jak i układ PD-1 (programmed death) – po prostu powodują supresję aktywacji – a ich formy rozpuszczalne mogą działać zupełnie odwrotnie jakby kompetycyjnie je zastępując, przeto, mogą prowadzić do nadmiernej aktywacji limfocytów – ciekaw jestem co na ten temat sądzi habilitantka?? W Abstrakcie pojawia się także następny błąd – odnosząc się do populacji kontrolnej z fizjologiczną ciążą obserwujemy wśród kobiet RSA obniżone poziomy s-Galektyny 9, sTIM-3, sCD155 a także sVISTA – ten ostatni nie jest w Abstrakcie wymieniony wśród czynników obniżonych. Natomiast rozpuszczalne biomarkery (potencjalne) sLAG3 są istotnie statystycznie podwyższone w grupie kobiet roniących – no i tylko te, albowiem dla sCD86 – te poziomy są nieistotnie statystycznie, zaś sCD80 jest istotnie obniżony względem kobiet nie będących w ciąży przeto jego wartość biomarkerowa jest tu wątpliwa. Wymienienie w Abstrakcie wśród potencjalnych markerów – rozpuszczalnej formy nektyny-2 – jest błędem, ponieważ jej poziomy są nieistotne statystycznie – zatem poświęcanie jej w Dyskusji osobnego akapitu – jest według mnie nadużyciem. Budzą wątpliwości potencjalne biomarkery sCD155, sCD80 i sCD86 (wcześniej dyskutowane), albowiem wyniki te są ekstrapolowane wobec grupy kobiet zdrowych, płodnych – zatem proponowanie ich jako biomarkerów, nawet potencjalnych wobec prognozy ciąży budzi spore zastrzeżenia. Nie wiem też dlaczego w Dyskusji podnosi się fakt istotnie podwyższonych poziomów sCD155 w ciąży fizjologicznej – korelując to z podwyższonymi poziomami sCD155 w nowotworach. Myślę, że ten tok rozumowania wyjaśni habilitantka. Ogólnie bardzo kiepska praca (w moim pojęciu).

Ostatnia publikacja z cyklu Osiągnięcie (*IJMS*, 2024, IF=4,91) jawi się jako dużo lepsza od poprzedniej. Zastrzeżeń jest jednak kilka. Po pierwsze grupa badana (z nawracającymi poronieniami) jest nieselekcjonowana względem przyczyn immunologicznych, można powiedzieć jest grupą losową, ale bada się u nich przyczyny immunologiczne. Przy niejasnym statusie tej grupy usiłuje się badać czynniki o niezbyt dobrze zrozumianej do dzisiaj funkcji – tj. tzw. struktura VISTA (ang. V-domain Ig-Containing Suppressor of T Cell Activation) oraz TIGIT (ang. T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain). Nie do końca dobrze scharakteryzowane są subpopulacje limfocytów (zwłaszcza NKT), zaś na ryc. 4 badane subpopulacje komórkowe nie różnią się między sobą fenotypowo, jednak jedna z nich definiowana jest w legendzie jako NK a druga NKT-podobna. Zwracam, także uwagę, że subpopulacja NKT różni się od NK zwłaszcza markerem CD 161, który w ogóle tu nie był rozpatrywany. Wracając do tych pseudomarkerów zwracam uwagę, że antygen powierzchniowy VISTA obniża się w sposób statystycznie znamienny (w populacjach T helper i T cytotoxic) w grupie kobiet z nawracającymi poronieniami, zaś podwyższa swoją ekspresję w subpopulacji komórek NK. Jest więc dosyć kłopotliwym do interpretacji markerem. Jeśli zaś chodzi o TIGIT jest on istotnie podwyższony w subpopulacjach NK oraz NKT-like i nieistotnie podwyższony (względem kobiet ciężarnych) w pozostałych badanych subpopulacjach (tj. na komórkach Treg, limfocytach T, limfocytach T helper i T cytotoxic. Jeśli chodzi o ekspresję TIM-3 (ang. T cell Immunoglobulin and Mucin Domain-Containing Protein



3) ulega on statystycznie istotnemu obniżeniu w populacjach limfocytów T cytotoxic oraz NK u kobiet z nawracającymi poronieniami (względem kobiet ciężarnych). Za to dosyć jednorodnie zachowują się antygeny PD-1 (*ang.* programmed cell death protein) oraz LAG-3 (*ang.* lymphocyte activation gene) konsekwentnie przedstawiając obniżoną ekspresję we wszystkich badanych subpopulacjach komórkowych u kobiet z nawracającymi poronieniami (wobec grupy kobiet z ciążą fizjologiczną). Te mogą w, w moim rozumieniu, w przyszłości być poddane skrupulatnej procedurze skierowanej na ocenę ich przydatności biomarkerowej. Interpretacja autorów często powikłana jest odniesieniami do drugiej grupy kontrolnej, tj. zdrowych i płodnych kobiet (w stosunku do kobiet z RSA), co jest w moim odczuciu niestosowne, skoro limfocyty od kobiet z RSA pobierano w obrębie 72 godzin po poronieniu – stosowną więc dla nich grupą odniesienia są kobiety będące w ciąży fizjologicznej. Dotyczy to także poprzedniej publikacji. Trzeba się też na chwilę zatrzymać nad fenomenem, kompensacyjnego podwyższenia ekspresji antygeny TIM na komórkach Treg, albowiem w poprzednich pracach komórki Treg obserwowane w grupie kobiet z RSA były również nadreprezentowane. I nie wiadomo czy to dobrze, czy źle? Chciałbym o to zapytać habilitantkę.

Reasumując moją ocenę Osiągnięcia, w warstwie formalnej spełnia ono wymagania w aspekcie bibliometrycznym oraz pod względem pierwszego autorstwa (w 5 z 7 publikacji Osiągnięcia habilitantka jest pierwszym autorem), co jest faktem pozytywnym dla zamierzonej promocji. Jak wspomniałem wcześniej, pomimo przyzwoitych współczynników cytowań, opublikowane prace nie były przyzwoicie recenzowane w odpowiednich redakcjach, co widać z wielu moich uwag przeprowadzonych w trakcie szczegółowego omawiania publikacji wchodzących w skład tego cyklu. Żadna z prac proponujących wyjaśnienie działania syldenafile nie ma charakteru próby klinicznej, randomizowanej itd., z czego finalnie niewiele wynika o wpływie syldenafile na parametry immunologiczne i co powinniśmy o tym sądzić. Cytrynian syldenafile, ma albowiem, często oddziaływanie ambiwalentne wobec cytokin lub innych mediatorów układu odpornościowego. Poddawane badaniom grupy pacjentek z nawracającymi poronieniami były zbierane losowo, a niektóre były co najmniej dziwne – tj. np. z obniżonym poziomem TNF alfa (podczas gdy w mojej praktyce najczęściej napotykam na kobiety roniące z podwyższonym poziomem TNF alfa a obniżonymi Treg) lub też podwyższonymi poziomami Treg. Badania przeprowadzane na niejednorodnych grupach pacjentek (brak badań autoimmunologicznych, alleli układu HLA i tzw. „overlap” pomiędzy potencjalnymi rodzicami, równoległe weryfikowanej aktywności i odsetka komórek NK, poszerzonego panelu cytokin na limfocytach aktywowanych) skutkują dosyć niespójnymi wnioskami. W badaniach immunologicznych „punktów kontrolnych” można jedynie wskazać na niektóre antygeny powierzchniowe, obiecujące dla ich późniejszej weryfikacji co do potencjału biomarkerowego. Praca dotycząca czynników rozpuszczalnych, moim zdaniem, nie ma w zasadzie oparcia poza luźnymi spekulacjami. We Wnioskach końcowych Osiągnięcia pozostajemy zatem przy tradycyjnym oddziaływaniu cytrynianu syldenafile na hamowanie fosfodiesterazy oraz ewentualnym wpływie na komórki NK i modulowaniu aktywacji komórek NK oraz NKT-podobnych czy też komórek Treg – jednak pozostaje to nadal w warstwie spekulatywnej i bardzo wstępnej. Ambivalenne oddziaływanie syldenafile na wydzielanie TNF alfa (jakkolwiek nie normalizujące) również



wymaga osobnego wytłumaczenia, chociaż może być zjawiskiem wtórnym wobec jego głównej pro-angiogennej osi działania. Oczekuję wyjaśnień habilitantki i sprecyzowania jej postawy interpretacyjnej wobec uzyskanych wyników oraz odpowiedzi na liczne wątpliwości co do natury/modelu tych obserwacji.

W wątku dotyczącym realizacji projektów naukowych należy odnieść się z uznaniem co do pracowitości habilitantki, czemu dałem wyraz w omawianiu jej dorobku. Uczestniczyła ona jako Wykonawca w 7 różnych projektach naukowych, była też Kierownikiem Projektu Młodego Badacza WUM oraz Projektu NCN Nr 2014/15/D/NZ7/01838 (Sonata). Obecnie realizuje Projekt we współpracy międzynarodowej, finansowany z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, z ośrodkami z Litwy, Włoch i Irlandii w zakresie personalizacji leczenia niepłodności i nawracających poronień. Wahałbym się czy wszystkie mają mieć tło idiopatyczne. Wśród dalszych Jej aktywności należy wymienić 3 wykłady na zaproszenie, 4 wystąpienia ustne (w jednym jako pierwszy autor) z zakresu prac oryginalnych i 25 przedstawionych doniesień w sesjach plakatowych. Brała też udział w 14 konferencjach naukowo-szkoleniowych, głównie krajowych. W warstwie dydaktycznej habilitantka informuje o prowadzeniu zajęć dydaktycznych dla IV i VI roku W. Lekarskiego WUM (nie wiemy co prawda jakie to są zajęcia?) oraz seminariów z immunopatologii dla studentów analityki medycznej W. Farmaceutycznego WUM. Była promotorem i opiekunem 2 prac magisterskich. Jako swoje osiągnięcia kandydatka wskazuje walidację testu aktywacji bazofili (trafił do paneli diagnostycznych) oraz wytworzenie zakresów referencyjnych dla immunofenotypowania głównych subpopulacji limfocytarnych, walidowała także metodę cytometryczną oceny mieszanej hodowli limfocytów – MLR. Jest laureatką 5 Nagród Rektorskich uczelni, a także wyróżnień za publikacje na międzynarodowych konferencjach w Mediolanie i Denwer (będąc w gronie współautorów tych doniesień).

W podsumowaniu oceny dorobku naukowego dr n med. Moniki Kniotek oraz przedstawionego przez nią Osiągnięcia, w celu ubiegania się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu (dyscyplina - nauki medyczne) stwierdzam, że Kandydatka spełnia wymogi Ustawy (art. 219) Prawa o Szkolnictwie wyższym z dnia 20 lipca 2018 roku – z zastrzeżeniem wobec licznych wątpliwości merytorycznych wobec Osiągnięcia, co sprawia że moje stanowisko może ulec zmianie w wyniku mojego Wniosku (który niniejszym czynię) o obligatoryjne wystąpienie habilitantki wobec Komisji habilitacyjnej, utworzonej Uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w którym ustosunkuje się ona do zawartych w Recenzji uwag.

Z poważaniem

C.
Maciej Kurpisz

Poznań, dnia 10.09. 2026