

Autoreferat

1. **Imię i nazwisko:** Monika Joanna Kniotek (Klochowicz, Ohams)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne

06. 11. 2013 – nadanie tytułu doktora nauk medycznych, w dyscyplinie Biologia Medyczna, specjalność Immunologia, nadany przez Radę Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, WUM (załącznik 2)

Temat rozprawy doktorskiej: „*Wpływ cytrynianu sildenafilu na aktywność komórek NK krwi obwodowej kobiet z nawracającymi poronieniami*” - opiekun naukowy prof. dr hab. n. med. Małgorzata Jerzak, Wojskowy Instytut Medyczny, Państwowy Instytut Badawczy (WIM PIB) w Warszawie.

17.09.2001 – nadanie tytułu magistra biologii w zakresie Biologii Ogólnej, specjalność Immunologia, Zakład Immunologii Uniwersytetu Warszawskiego (UW)

Temat pracy magisterskiej: „*Degranulacja bazofili pod wpływem alergenów - Ocena ekspresji cząsteczki CD63*” - opiekun prof. dr n. biol. Nadzieja Drela

2001 – nadanie tytułu Inspektora Ochrony Radiologicznej przez Państwową Agencję Atomistyki (PAA)

2005 - nadanie tytułu Diagnosty Laboratoryjnego przez Krajową Izbę Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL), nr prawa wykonywania zawodu 07017.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2021 – obecnie – Adiunkt, Zakład Immunologii Klinicznej, WUM

2010 - 2021 – Asystent, Zakład Immunologii Klinicznej, WUM

2001 - 2020 - Diagnosta laboratoryjny, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM

2001 – 2010 – Pracownik naukowo-techniczny - Zakład Immunologii Klinicznej, WUM

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Ogólne dane naukometryczne dotyczące dorobku z całej kariery zawodowej na podstawie analizy bibliometrycznej:

Liczba publikacji zatwierdzonych przez WUM - 37

Łączny IF - 104,591; Liczba punktów MNiSW - 2196

Liczba cytowań = 748 (WoS); index Hirscha = 13

	Przed doktoratem		Po doktoracie	
	IF	MNiSW	IF	MNiSW
Oryginalne prace pełnotekstowe	20,34	210	67,327	1706
Opisy przypadków	-	-	0,918	15
Prace pogładowe	-	-	7,998	65
Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism	-	-	8,200	200
Suma	20,348	210	84,443	1 986

Tab.1. Zbiorcze przedstawienie analizy bibliometrycznej.

4.2. Tytuł osiągnięcia naukowego: *Określenie mechanizmu immunomodulacyjnego działania cytrynianu sildenafilu (SC) 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. (Zaburzenia regulacji immunologicznej w nawracających poronieniach)*

4.2.1. Lista publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu naukowego

W skład mojego cyklu habilitacyjnego wchodzi 7 publikacji: 6 prac oryginalnych oraz 1 pogładowa, opublikowanych w latach 2015-2024, o sumarycznym IF 26,95 oraz 695 pkt. MNiSW, w tym 17,5 IF oraz 415 pkt. MNiSW z prac oryginalnych. We wszystkich pracach pełniłam rolę autora korespondencyjnego, a w przypadku 5 jestem pierwszym autorem. Większość prac do cyklu powstało w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), którego byłam kierownikiem i głównym badaczem. Dwie prace z cyklu powstały podczas badań studenta Szkoły Doktorskiej WUM prowadzonych pod moim nadzorem.

Cykl obejmuje następujące publikacje:

1. **Kniotek M.** Boguska A.S. *Sildenafil Can Affect Innate and Adaptive Immune System in Both Experimental Animals and Patients*, Journal of Immunology Research, 20174541958. <https://doi.org/10.1155/2017/4541958>, kwartył - Q2, IF = 4,9, 140 pkt. MNiSW

2. **Ohams M.** Jerzak M., Górski A. *Effects of sildenafil citrate and etanercept treatment on TNF- α levels in peripheral blood of women with recurrent miscarriage*, Ginekologia polska, 2015, (86)7: 520-4. doi:10.17772/gp/57823, kwartyl Q4, IF= 0,69, 15 pkt. MNiSW
3. **Kniotek M.** Roszczyk A, Zych M, Szafarowska M, Jerzak M. *Differences in the Expression of KIR, ILT Inhibitory Receptors, and VEGF Production in the Induced Decidual NK Cell Cultures of Fertile and RPL Women*, BioMed Research International vol. 2021 6673427. 4 May. 2021, doi:10.1155/2021/6673427, kwartyl-Q2, IF= 2,46, 20 pkt. MNiSW4.
4. **Kniotek M.** Roszczyk A, Zych M, Wrzosek M, Szafarowska M, Zagożdżon R, Jerzak M. *Sildenafil Citrate Downregulates PDE5A mRNA Expression in Women with Recurrent Pregnancy Loss without Altering Angiogenic Factors-A Preliminary Study*, Journal of Clinical Medicine vol. 10,21 5086. 29 Oct. 2021, doi:10.3390/jcm10215086, kwartyl Q2, IF = 4,96, 140 pkt. MNiSW
5. **Kniotek M.** Zych M, Roszczyk A, Szafarowska M, Jerzak MM. *Decreased Production of TNF- α and IL-6 Inflammatory Cytokines in Non-Pregnant Idiopathic RPL Women Immunomodulatory Effect of Sildenafil Citrate on the Cellular Response of Idiopathic RPL Women.* Journal of Clinical Medicine vol. 10,14 3115. 15 Jul. 2021, doi:10.3390/jcm10143115, kwartyl - Q2, IF = 4,964, 140 pkt MNiSW
6. Zych M, Roszczyk A, Filip Dabrowski, **Kniotek M.** Radosław Zagożdżon, *Soluble Forms of Immune Checkpoints and Their Ligands as Potential Biomarkers in the Diagnosis of Recurrent Pregnancy Loss—A Preliminary Study*, IJMS, vol. 25,1 499. 29 Dec. 2023, doi:10.3390/ijms25010499, kwartyl -Q1, IF = 4, 140 pkt MNiSW
7. Zych, M., **Kniotek, M.** Roszczyk, A., Dąbrowski, F., Jędra, R., Zagożdżon, R. *Surface Immune Checkpoints as Potential Biomarkers in Physiological Pregnancy and Recurrent Pregnancy Loss*, IJMS, vol. 25,17 9378. 29 Aug. 2024, doi:10.3390/ijms25179378, kwartyl - Q1, IF =4,91, 140 pkt. MNiSW

4.2.2. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników w/w prac oraz ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Problem nawracających poronień

Poronienia nawykowe stały się problemem społecznym o dużej skali. W Polsce każdego roku średnio rejestrowane jest 340 tysięcy ciąż spośród których ok. 5% zostanie utraconych w wyniku nawracających poronień (*ang. recurrent pregnancy loss, RPL*), czyli ok. 17 tysięcy z nich zostanie utraconych [1]. Zjawisko nawracających utrat ciąż ma znaczący wpływ na współczynnik dzietności w Polsce, który wynosi obecnie 1,17, i jest jednym z najniższych w Europie [2].

Według Amerykańskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu (*American Society of Reproductive Medicine*), nawracające / nawykowe poronienia (*ang. Recurrent Pregnancy Loss, RPL*) definiuje się jako straty co najmniej dwóch ciąż. Natomiast definicja Europejskiego Towarzystwa Rozrodu i Embriologii Człowieka (*European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE*) uznaje RPL jako co najmniej 3 poronienia przed 12 tygodniem trwania ciąży, oraz 2 poronienia między 12 a 20 tygodniem trwania ciąży, w tym samym układzie partnerskim. Klinicznie RPL wg ESHRE podzielono na wczesne - RPL do 12 tygodnia ciąży oraz późne - pojawiające się między 13 a 21 tygodniem ciąży [4,5]. W moich badaniach przyjęłam definicję RPL wg wytycznych ESHRE dla wczesnych poronień i takie pacjentki były kwalifikowane do badań opisanych w pracach. W przeważającej większości badania były prowadzone u pacjentek, u których upłynęło co najmniej 6 miesięcy od ostatniego poronienia, więc samo traumatyczne zdarzenie nie powinno mieć wpływu na parametry immunologiczne (prace nr 2, 3, 4, i 5 z cyklu). W przypadku publikacji 6 i 7 przedstawionych w cyklu, do badań wykorzystano surowicę krwi oraz krew obwodową pobraną od pacjentek bezpośrednio po poronieniu (do 72 h od poronienia), kobiet ciężarnych (do 13 tygodnia ciąży), oraz wieloródek (kobiety po co najmniej jednej fizjologicznej ciąży bez powikłań w jej przebiegu).

Ciąża jako pół-przeszczep (ang. semi - allograft)

Z punktu widzenia immunologii, ciąża jest szczególnym zjawiskiem, gdyż płód ekspresuje na swojej powierzchni antygeny głównego układu zgodności tkankowej (HLA) zarówno od matki, jak i od ojca. Ze względu na taką unikalną ekspresję, płód jest często określany jako półprzeszczep (*ang. semi-allograft*). By ciąża rozwinęła się prawidłowo i zakończyła fizjologicznym porodem, muszą zostać uruchomione mechanizmy tolerancji układu immunologicznego matki na antygeny płodowe. Sam płód wpływa na aktywację mechanizmów

tolerancji poprzez wydzielanie hormonów, np. gonadotropiny kosmówkowej (β -hCG), oraz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vehicles*, EVs), zawierających białka oraz antygeny HLA-G [6]. Organizm matki dynamicznie zmienia swój profil hormonalny, a hormony płciowe bezpośrednio wpływają na aktywację limfocytów oraz uczestniczą w dojrzewaniu limfocytów T. Subpopulacje limfocytów T, w tym limfocyty pomocnicze CD4 (Th), podlegają modulacji przez estrogeny. Niskie stężenia estrogenów sprzyjają odpowiedzi komórkowej zależnej od limfocytów Th1, zarówno w macicy, jak i *in vitro*, m.in. poprzez zwiększoną produkcję IFN- γ , natomiast wysokie stężenia estrogenów tą odpowiedź hamują. Ilość oraz różnicowanie limfocytów T regulatorowych (Treg) są również kontrolowane i indukowane przez estrogeny. Progesteron natomiast utrzymuje homeostazę immunologiczną, równoważąc odpowiedzi Th1/Th2 oraz Th17/Treg wspierając tym samym rozwój tolerancji maczyno-płodowej [7]. Limfocyty T pod wpływem progesteronu produkują czynnik hamujący indukowany przez progesteron (ang. *progesterone induced blocking factor*, PIBF), który promuje immunoregulacyjną odpowiedź typu Th2, osłabia aktywność komórek NK i cytotoksycznych limfocytów T [7]. Trofoblastyczne EVs stymulują wydzielanie IL-10, co dodatkowo wspiera dominację odpowiedzi Th2 [5]. Przesunięcie odpowiedzi immunologicznej w kierunku prozapalnej Th1, wzmożona aktywacja komórek cytotoksycznych, oraz zaburzenie równowagi Treg/Th17 są uznawane za kluczowe mechanizmy immunologiczne leżące u podłoża nawracających poronień [6,7].

Cytrynian sildenafilu w leczeniu niepłodności i zaburzeń ciąży

Cytrynian sildenafilu, inhibitor fosfodiesterazy typu 5 (PDE5), jest lekiem znanym głównie z leczenia zaburzeń erekcji u mężczyzn, jednak znalazł również zastosowanie w leczeniu niektórych przypadków niepłodności oraz zaburzeń ukrwienia łożyska u kobiet. Jego mechanizm działania opiera się na rozszerzaniu naczyń krwionośnych poprzez zwiększenie stężenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), co prowadzi do relaksacji mięśni gładkich w ścianach naczyń krwionośnych i poprawy przepływu krwi w niektórych narządach, w tym macicy i łożysku [8,9].

Zastosowanie SC w leczeniu niepłodności

W leczeniu niepłodności sildenafil znalazł zastosowanie przede wszystkim u pacjentek z nieprawidłowym rozwojem endometrium, zwłaszcza w ramach procedur wspomaganego rozrodu (ang. *assisted reproduction*, ART). Cienkie endometrium (<7 mm) jest czynnikiem

ryzyka niepowodzenia implantacji zarodka. Sildenafil podawany dopochwowo lub doustnie może poprawiać perfuzję macicy oraz prowadzić do zwiększenia grubości endometrium i jego receptywności [9,10]. W badaniach Sher i wsp.[8], jak i w naszym, Jerzak et al. [9], zastosowanie dopochwowe sildenafilu u pacjentek z cienkim endometrium prowadziło do jego pogrubienia oraz wzrostu wskaźnika cięż klinicznych [8,9]. Inne badania potwierdziły poprawę parametrów endometrium, choć nie wszystkie wykazały istotny wpływ SC na końcowy wynik leczenia IVF [11]. Mechanizm działania SC obejmuje lokalne rozszerzenie naczyń tętnic macicznych, co zwiększa przepływ krwi i wspomaga odpowiedź błony śluzowej macicy na stymulację hormonalną [10]. SC był również badany jako potencjalny lek poprawiający ukrwienie łożyska w przypadku wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu płodu (ang. *intrauterine growth restriction, IUGR*) oraz w niewydolności łożyska. Jego stosowanie miało na celu zmniejszenie oporu naczyniowego w tętnicach macicznych i poprawę przepływu krwi w krążeniu maciczno-łożyskowym [10]. W ramach międzynarodowego badania STRIDER (*Sildenafil Therapy In Dismal Prognosis Early-onset Intrauterine Growth Restriction*) oceniano wpływ doustnego SC na przebieg ciąży z ciężką postacią IUGR. Badanie w ośrodkach w Wielkiej Brytanii i Nowej Zelandii nie wykazało istotnej poprawy przeżywalności płodów, a jego holenderska część została przerwana przedwcześnie z powodu zwiększonego ryzyka nadciśnienia płucnego i zgonów noworodków [13,14]. Wyniki te skłaniają do dużej ostrożności w rozważaniu stosowania SC w ciąży i wskazują na konieczność dalszych badań klinicznych. Mając na uwadze powyższe dane o teratogennym działaniu SC na płód, w moich badaniach lek był stosowany u pacjentek przed poczęciem jako globulki dopochwowe lub w badaniach *in vitro* w hodowlach komórkowych.

Wybór leku do badań wynikał m.in. z wcześniejszych wyników uzyskanych w ramach mojej pracy doktorskiej, które wskazywały na immunomodulacyjne właściwości SC. W szczególności wykazałam, że SC obniżał aktywność komórek NK u pacjentek z idiopatycznymi nawracającymi poronieniami (uRPL) *in vitro* i *in vivo* oraz modulował stężenie cytokiny prozapalnej TNF- α . Użyte stężenie leku w badaniach 400 ng/ml odpowiada maksymalnemu stężeniu leku po podaniu dawki doustnej 50 mg [1].

4.3.2. Grupa badana

Do badań były kwalifikowane pacjentki z trzema lub więcej poronieniami naturalnymi jak i po interwencji *in vitro*, wg definicji nawracających poronień ESHRE.

Grupę kontrolną w moich badaniach stanowiły zdrowe kobiety z przynajmniej 1 ciążą fizjologiczną, zakończoną fizjologicznym porodem, nazywane w artykułach wieloródkami. W

2 ostatnich pracach cyklu pobierano również krew od zdrowych ciężarnych kobiet w 13 tygodniu ciąży fizjologicznej.

U wszystkich pacjentek, kobiet ciężarnych oraz wieloródek, wykonano dopochwowe badania ultrasonograficzne, pomiędzy 3 a 5 dniem cyklu miesięczkowego (przed poczęciem), aby wykluczyć zmiany anatomiczne i morfologiczne macicy, endometrium i przydatków. Wszystkie kobiety zostały przebadane i inne przyczyny RPL (hormonalne, anatomiczne, mikrobiologiczne czy genetyczne) zostały wykluczone. Do badań zostały wybrane kobiety w wieku rozrodczym oraz wskaźnikiem BMI w normie.

Ogółem w ramach badań do w/w publikacji przebadanych zostało 80 pacjentek z RPL oraz 80 wieloródek i 20 kobiet ciężarnych.

4.3.3. Omówienie wyników prac

Publikacja 1

Kniotek M, Boguska A. Sildenafil Can Affect Innate and Adaptive Immune System in Both Experimental Animals and Patients, Journal of Immunology Research, 2017;45:41958. <https://doi.org/10.1155/2017/4541958>

Indywidualny procentowy wkład w powstanie pracy oceniam na 70%: Moja rola w powstaniu publikacji polegała na wyselekcjonowaniu literatury i informacji do pracy przeglądowej oraz napisaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz złożeniu jego ostatecznej wersji do czasopisma.

Immunomodulujące działanie SC sugerowano w pracach dotyczących chorób autoimmunologicznych i neurologicznych. Praca opisuje strukturę i działanie SC. Lek ten działa on poprzez blokowanie rozkładu cyklicznego monofosforanu guanozyny (cGMP), konkurując o miejsce wiązania z PDE5A. cGMP jest przekaźnikiem wtórnym, który aktywuje kinazy białkowe i pełni rolę regulatora przewodnictwa kanałów jonowych, glikogenolizy oraz apoptozy komórkowej. Inhibitory PDE5 znalazły szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny, takich jak kardiologia, nefrologia, urologia, dermatologia, onkologia i ginekologia. W pracy pokazałam, iż skuteczność leczenia SC wiąże się z jego działaniem immunomodulującym. Sildenafil wpływał na procesy angiogenezy, aktywację płytek krwi, proliferację regulatorowych limfocytów T oraz produkcję prozapalnych cytokin i autoprzeciwciał [15]. Działanie sildenafilu może się różnić w zależności od tego, czy jest stosowany u ludzi, czy zwierząt. Karakhanova i wsp., wykazali, że SC ma różne efekty na układ odpornościowy u samców i samic myszy [15]. Sugeruje to wrażliwość na lek w zależności od zmian hormonalnych. W modelach przedklinicznych leczenia raka trzustki połączenie

inhibitora PDE-5 z immunoterapią prowadziło do przeprogramowania komórek mieloidalnych i zwiększenia aktywności limfocytów T, co skutkowało poprawą odpowiedzi przeciwnowotworowej [16]. W przypadku raka płaskonabłonkowego przeprowadzono badanie kliniczne z tadalafilami [10,17]. Inhibitory PDE-5 wykazują potencjał szczególnie w kontekście terapii nowotworowych. Ich zdolność do zmniejszania immunosupresji w mikrośrodku guza i wspierania aktywności limfocytów T uczyniła je obiecującymi kandydatami do terapii skojarzonej z innymi formami immunoterapii. Jednakże niezbędne są dalsze badania kliniczne w celu pełnego poznania mechanizmów działania oraz opracowania optymalnych strategii terapeutycznych, co stanowi jeden z elementów moich badań.

Powyższa publikacja to jeden z pierwszych przeglądów aktualnych informacji na temat działania sildenafilu na układ odpornościowy ludzi oraz zwierząt laboratoryjnych.

Publikacja 2

Ohams M, Jerzak M., Górski A., *Effects of sildenafil citrate and etanercept treatment on TNF- α levels in peripheral blood of women with recurrent miscarriage*, Ginekologia Polska vol. 86,7 (2015): 520-4. doi:10.17772/gp/57823

Indywidualny wkład w publikację oceniam na 60%: Moja rola polegała na przeprowadzeniu oceny stężenia TNF- α w surowicy pacjentek, wykonaniu analiz wyników (w tym analizy statystycznej), oraz przygotowaniu manuskryptu i złożeniu jego ostatecznej wersji do czasopisma.

Celem pracy było porównanie wpływu terapii SC oraz etanerceptem na produkcję TNF- α w grupie pacjentek z uRPL .

Etanercept jest dimerycznym rozpuszczalnym receptorem TNF- α . Jest to białko chimeryczne stanowiące połączenie domeny Fc ludzkiej IgG1 oraz receptora 2 ludzkiego TNF-TNFR2/p75, wiążącej się z zewnątrzkomórkowymi ligandami. Etanercept podawany był 2 razy w tygodniu, podskórnie po 4 dawki po 25 mg. Natomiast SC podawano 4 razy dziennie w globulkach dopochwowych po 200 mg. Leki podawane były pacjentkom przed poczęciem, od 3-6 dnia cyklu miesięczkowego. Czas podania wykluczał ewentualne skutki teratogenne leków na płód. Próbkę krwi obwodowej do badań poziomu stężenia TNF- α w surowicy były pobierane między 16 a 25 dniem cyklu rozrodczego w fazie lutealnej, w szczytowym punkcie produkcji progesteronu, i przynajmniej 10 dni od zastosowania terapii. Poziom cytokiny w zebranych próbkach określałam metodą Elisa.

Uzyskane wyniki: Pacjentki, które były kwalifikowane do leczenia etanerceptem, przed terapią wykazywały istotnie podwyższony poziom TNF- α w porównaniu do wieloródek.

259 Etanercept istotnie obniżał stężenie TNF- α w surowicy pacjentek.

260 Poziom TNF- α u pacjentek z uRPL zakwalifikowanych do leczenia SC nie różnił się od
261 poziomu tej cytokiny oznaczanego w surowicy wieloródek. Podanie dopochwowo SC
262 podwyższało poziom TNF- α w surowicy krwi obwodowej pacjentek z uRPL do analogicznych
263 poziomów uzyskanych u pacjentek po terapii biologicznej etanerceptem. (załączniki:
264 publikacja 2, Tab.1. str.523)

265 Na podstawie przeprowadzonych badań mogłam sformułować następujące wnioski:

- 266 • Kobiety z uRPL wykazują zaburzenia immunologiczne, manifestujące się
267 podwyższonym stężeniem TNF- α w surowicy, zwłaszcza w podgrupie pacjentek
268 kwalifikowanych do terapii etanerceptem.
- 269 • Etanercept skutecznie i istotnie obniża poziom TNF- α , co potwierdza jego
270 potencjał jako leku modulującego nieprawidłową odpowiedź zapalną u pacjentek z
271 uRPL. Wynik ten podkreśla, że neutralizacja TNF- α może być obiecującą strategią
272 terapeutyczną w tej grupie chorych.
- 273 • Pacjentki zakwalifikowane do terapii SC nie różniły się wyjściowym poziomem
274 TNF- α od zdrowych wieloródek, co wskazuje, że nadprodukcja TNF- α nie jest
275 dominującym mechanizmem immunologicznym w całej populacji uRPL — dotyczy
276 raczej wybranej podgrupy pacjentek.
- 277 • Dopochwowe podanie SC podwyższało poziom TNF- α , jednak – co istotne –
278 jego ostateczny poziom odpowiadał wartościom obserwowanym u pacjentek po
279 leczeniu etanerceptem. Sugeruje to, że lek ten nie działa immunosupresyjnie *per se*, lecz
280 może modulować lokalno-systemowy mikrośrodowiskowy stan zapalny.
- 281 • SC i etanercept— mimo odmiennego mechanizmu działania — prowadziły do
282 wyrównania stężenia TNF- α w kierunku wartości obserwowanych w ciąży prawidłowej
283 (u wieloródek). Zjawisko to wskazuje, że zarówno terapia biologiczna (anty-TNF), jak
284 i terapie poprawiające perfuzję i funkcję błony śluzowej macicy (np. SC), mogą
285 korygować zaburzoną równowagę cytokinową u części pacjentek z uRPL.

286 Badanie podkreśla znaczenie personalizacji leczenia uRPL, ponieważ różne podtypy pacjentek
287 (z podwyższonym vs. prawidłowym poziomem TNF- α) mogą wymagać odmiennych strategii
288 terapeutycznych.

Publikacja 3

Kniotek M, Roszczyk A, Zych M, Szafarowska M, Jerzak M, Differences in the Expression of KIR, ILT Inhibitory Receptors, and VEGF Production in the Induced Decidual NK Cell Cultures of Fertile and RPL Women, Biomed Res Int. 2021 May 4;2021:6673427.

Indywidualny wkład procentowy w powstanie pracy oceniam na 60%. Moja rola polegała na sformułowaniu hipotezy badawczej, zdobyciu funduszy na badania (grant NCN), przeprowadzeniu przekształcenia obwodowych komórek NK w doczesnowe, przeprowadzeniu badań cytometrycznych ekspresji receptorów KIR, interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz jego poprawę wg uwag recenzentów i złożeniu jego ostatecznej wersji do czasopisma.

Cele badawcze przedstawione w pracy to:

1. Zbadanie wpływu SC na komórki doczesnowe idNK,

a) Ocena ekspresji receptorów hamujących KIR,

b) Ocena produkcji czynnika angiogenego VEGF-A przez idNK,

c) Oznaczenie toksyczności leku dla komórek idNK.

Opis badania:

Aby otrzymać komórki doczesnowe NK pacjentek z RPL, izolowałam obwodowe komórki pbNK o fenotypie CD56⁺CD3⁻, a następnie przekształcałam je w doczesnowe komórki idNK metodą opisaną przez Cadeira i wsp. [17]. Pod wpływem hipoksji, czyli atmosfery 94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂ i w odpowiednim medium hodowlanym opartym na podłożu Opti-MEM, uzupełnionym rekombinowanymi ludzkimi cytokinami IL-15 i TGF-β oraz środkiem hipometylującym DNA (5-Aza-2'-deoksycytidyna), komórki pbNK o fenotypie CD45⁺CD3⁻CD56⁺CD16^{+/-} przekształcałam w komórki indukowane doczesnowe NK (idNK) o fenotypie CD45⁺CD3⁻CD56^{bright}CD16⁻. Następnie badałam metodą cytometrii przepływowej zmiany w ekspresji receptorów KIR ważnych w procesie utrzymania ciąży: KIR2DL1 (CD158a), NKG2A (CD159a), ILT2 (CD85j) i ILT-4 (CD85d).

Zebrane supernatanty znad hodowli posłużyły do oznaczenia stężenia czynnika śródbłonkowego wzrostu (ang. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-A). Stężenie VEGF-A w supernatantach hodowlanych oceniałam metodą ELISA.

Ewentualny cytotoksyczny wpływ SC na komórki idNK oceniałam badając stopień apoptozy i nekrozy idNK po barwienia aneksyną oraz jodkiem propidyny (analiza cytometryczna).

Uzyskałam następujące wyniki:

a) Ocena receptorów KIR:

325 KIR2DL1 (CD158a) - na komórkach idNK był istotnie obniżony u pacjentek z uRPL w
326 porównaniu do grupy kontrolnej. SC nieznacznie wpływał na jego podwyższenie w grupie RPL,
327 natomiast znacząco w grupie wieloródek.

328 NKG2A (CD159a) - SC w stężeniu 400 ng/ml istotnie zwiększał ekspresję NKG2A na
329 komórkach idNK u pacjentek z RPL.

330 NKG2A/KIR2DL1 - ko-ekspresja receptorów hamujących na komórkach RPL idNK znacząco
331 wzrosła po hodowli uzupełnionej SC.

332 ILT-2 (LILR-1, CD85j) - Ekspresja receptora ILT-2 (CD85j) była znacznie obniżona na
333 komórkach idNK u pacjentek z uRPL (załączniki: publikacja 3, Fig.1. str.5)

334 b) Ocena stężenia VEGF-A:

335 Supernatanty z hodowli idNK pacjentek z RPL zawierały niższe stężenia śródbłonkowego
336 czynnika wzrostu w porównaniu do stężeń w hodowlach idNK wieloródek (załączniki:
337 publikacja 3, Fig.3. str.6.).

338 c) Apoptoza/Nekroza idNK

339 Nie zaobserwowałam zmian w odsetku komórek idNK z wczesną i późną apoptozą lub nekrozą
340 w hodowlach z SC w porównaniu do hodowli bez leku (załączniki: publikacja 3, Fig.2. str.6)

341

342 Wnioski z wyników pracy:

343 • SC promuje dojrzewanie oraz immunoregulacyjny fenotyp idNK.

344 Zaobserwowałam, że SC zwiększa ekspresję kluczowych receptorów hamujących KIR, w tym
345 KIR2DL1 oraz NKG2A, przywracając ich poziom w kierunku wartości obserwowanych u
346 wieloródek. Jest to istotne, ponieważ obniżenie ekspresji tych receptorów wiąże się zarówno z
347 uRPL, jak i ze stanami dysfunkcji łożyska, w tym stanem przedrzucawkowym [18].

348 • SC zwiększa ko-ekspresję NKG2A/KIR2DL1 na idNK u pacjentek z uRPL.
349 Populacja idNK podwójnie dodatnich dla NKG2A/KIR2DL1 jest odpowiedzialna za
350 wydzielanie znacznych ilości IFN- γ i prawidłowy przebieg implantacji [19]. Jej niski poziom
351 wiązano z niepowodzeniem rozrodu. Zwiększenie odsetka tej populacji po zastosowaniu SC
352 sugeruje działanie wspierające prawidłową transformację doczesnową i rozwój łożyska.

353 • Komórki idNK pacjentek z uRPL wykazywały obniżoną ekspresję KIR2DL1 oraz ILT
354 2, zgodnie z danymi literaturowymi dotyczącymi dysfunkcji uNK w patologii implantacji i
355 wczesnej ciąży [19,20]. Potwierdziłam zaburzenia immunofenotypu idNK w uRPL.

356 • SC nie wpływał istotnie na wydzielanie VEGF-A przez idNK.
357 Stężenia VEGF-A w supernatantach z hodowli z SC nie różniły się od hodowli kontrolnych, co

jest zgodne z wynikami innych autorów i wskazuje, że immunomodulujący efekt SC nie jest mediowany przez modulację angiogenezy idNK.

- SC nie wywiera cytotoksycznego działania na komórki idNK. Analiza apoptozy i nekrozy (barwienie Annexin V / PI) wykazała brak różnic między hodowlami z SC i bez leku. Potwierdza to bezpieczeństwo SC w odniesieniu do żywotności komórek doczesnowych NK.

Podsumowując, SC wspiera prawidłowe dojrzewanie i funkcję idNK oraz promuje ich hamujący, tolerogenny fenotyp, który może chronić implantację i wczesną ciążę poprzez ograniczenie cytotoksycznego rozpoznania trofoblastu. Efekty te mogą mieć znaczenie w zapobieganiu nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej prowadzącej do uRPL lub powikłań łożyskowych, takich jak stan przedrzucawkowy. Bardzo ważny jest brak cytotoksycznego wpływu SC na komórki układu immunologicznego.

Publikacja 4

Kniotek M, Roszczyk A, Zych M, Wrzosek M, Szafarowska M, Zagożdżon R, Jerzak M, Sildenafil Citrate Downregulates PDE5A mRNA Expression in Women with Recurrent Pregnancy Loss without Altering Angiogenic Factors - A Preliminary Study, J Clin Med. 2021 Oct 29;10(21):5086.

Indywidualny wkład w publikację oceniam na 50%. Moja rola polegała na sformułowaniu hipotezy badawczej, zdobyciu funduszy na badania, przeprowadzeniu hodowli transformujących komórki NK, przygotowaniu komórek do izolacji RNA, ocenie stężenia czynników angiogennych w hodowlach, wykonaniu analizy statystycznej wyników, ich interpretacji, przygotowaniu manuskryptu i złożeniu jego ostatecznej wersji do czasopisma.

Cele badawcze przedstawione w pracy to:

- Ocena wpływu SC na ekspresję czynników angiogennych ważnych w tworzeniu naczyń spiralnych i rozwoju łożyska w czasie ciąży: VEGF-A, PIGF, RENB, IL-8 oraz PDE-5.
- Ocena aktywności komórek idNK

Badania na zwierzętach i ludziach wykazały kluczową rolę VEGF-A w utrzymaniu unaczynienia płodu i łożyska, a zmniejszona ekspresja VEGF-A była związana z wadliwą embriogenezą i utratą płodu. W czasie ciąży VEGF-A jest niezbędny do proliferacji komórek trofoblastu oraz rozwoju unaczynienia maczyno-zarodkowego w macicy [10,21]. VEGF-A odgrywa nadrzędną rolę w procesie angiogenezy i przebudowy naczyń krwionośnych w czasie ciąży [10,21,].

Czynnik wzrostu łożyska (ang. Placental Growth Factor, PlGF) wraz z VEGF jest odpowiedzialny za przemiany naczyniowe w trakcie tworzenia łożyska. PlGF należy do rodziny czynników wzrostu śródbłonna naczyniowego. Odgrywa kluczową rolę w angiogenezie podczas tworzenia łożyska. Wykorzystuje do przekazania sygnału receptory dla VEGF, (VEGFR), stymulując proliferację i migrację komórek śródbłonna [10, 22]. Wartości sFlt-1/PlGF u kobiet ze stanem przedrzucawkowym są wskazywane jako wartości diagnostyczne [24]. PlGF ulega ekspresji w komórkach endometrium, łożyska i trofoblastu, bierze udział w dojrzewaniu komórek NK macicy. Wykazano, że doczesnowe komórki NK wykazują wyższą ekspresję PlGF w ciążach fizjologicznych w porównaniu z ciążami wysokiego ryzyka [25].

Natomiast układ renina–angiotensyna (RAS) odgrywa kluczową rolę w regulacji ciśnienia tętniczego, objętości osocza oraz perfuzji narządowej, w tym maciczo-łożyskowej, co jest szczególnie istotne w czasie ciąży. W fizjologicznej ciąży obserwuje się wzrost aktywności zarówno krążącego, jak i tkankowego RAS, co wspiera adaptację układu krążenia matki oraz angiogenezę i rozwój łożyska [26,27].

Inny czynnik angiogeny badany przez mnie to interleukina 8 (IL-8). IL-8 została powiązana z nawracającymi stratami ciąży i może odgrywać rolę zarówno we wczesnych, jak i późnych powikłaniach ciąży [27].

Blokowanie enzymu PDE-5 przez SC pośrednio zwiększa poziom tlenku azotu (NO) w tkankach. Określono, iż NO mediuje aktywność cytotoksyczną komórek NK, a inhibitory syntezy NO osłabiają zdolność komórek NK do zabijania komórek docelowych [28].

W badaniu uzyskałam następujące wyniki:

a) Ocena ekspresji genów

PDE-5 – ekspresja genu dla fosfodiesterazy typu 5 idNK była istotnie niższa po hodowli z SC u kobiet z nawracającymi utratami ciąży uRPL (Ryc.1),

VEGF-A – tendencja do niższej ekspresji genu w idNK kobiet z uRPL w porównaniu do idNK wieloródek. Brak efektu SC.

PlGF - tendencja do niższej ekspresji genu u kobiet z uRPL w porównaniu do idNK wieloródek. SC nie wpływał na to zjawisko.

RENB - poziom ekspresji genu był podobny dla komórek idNK wieloródek oraz kobiet uRPL przed i po hodowli z SC.

IL-8 - ekspresja genu dla tej cytokiny nie wykazywała różnic przed i po hodowli z SC, jednakże u kobiet z uRPL wykazano tendencję do średniej wyższej ekspresji IL-8.

b) Ocena aktywności idNK

Nie wykazałam zmian w aktywności komórek idNK zarówno po hodowli z SC, jak i po dodaniu inhibitora syntazy tlenu azotu (L-NMMA), mierzoną stopniem degranulacji NK czyli pojawieniem się cząsteczki LAMP-1 (CD107a) na błonie komórkowej idNK po 4-godzinnej stymulacji PMA/ionomycyna w obecności monensyny.

Na podstawie przeprowadzonych badań mogłam sformułować następujące wnioski:

- SC obniża ekspresję PDE5A w komórkach idNK pacjentek uRPL (rycina 1, str. 6 w załączonej publikacji 4).

Zaobserwowałam istotne obniżenie poziomu transkryptu *PDE5A* po hodowli z SC, szczególnie wyraźne w grupie uRPL. Wynik ten wskazuje, że komórki idNK kobiet z niewyjaśnioną utratą ciąży są bardziej wrażliwe na działanie SC niż komórki idNK wieloródek. Efekt ten potwierdza bezpośrednie działanie SC na szlak NO/cGMP poprzez regulację ekspresji PDE-5.

- Zmniejszona ekspresja genów *VEGF-A* i *PLGF* w komórkach idNK pacjentek z uRPL potwierdza zaburzenia angiogenezy charakterystyczne dla tej grupy. W badaniu wykazano tendencję do niższej ekspresji *VEGF-A* oraz *PLGF* u pacjentek z uRPL w stosunku do zdrowych wieloródek, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami dotyczącymi poziomu białka VEGF-A oraz danymi literaturowymi o osłabionym profilu angiogennym w uRPL.

- SC nie wpływał na ekspresję genów dla czynników angiogennych VEGF-A, PLGF, RENB oraz IL-8 w komórkach idNK.

Wynik ten pokazuje, że działanie SC na komórki idNK nie odbywa się poprzez modyfikację ich profilu angiogennego. Zarówno czynniki związane z rozwojem naczyń (VEGF-A, PLGF), elementy lokalnego układu renina–angiotensyna (RENB), jak i cytokina proangiogenna IL-8 nie reagowały na SC zmianą ekspresji genów.

- IL-8 wykazywała tendencję do wyższej ekspresji u pacjentek z uRPL, niezależnie od działania SC. Może to odzwierciedlać stan przewlekłej aktywacji immunologicznej w uRPL, zgodnie z doniesieniami wskazującymi na rolę IL-8 w patogenezie poronień nawracających [29].

- SC nie wpływa na aktywność cytotoksyczną komórek idNK. Zarówno SC, jak i inhibitor NO (L-NMMA) nie zmieniały stopnia degranulacji (ekspresji CD107a) idNK po stymulacji. Sugeruje to, że SC nie moduluje bezpośrednio potencjału cytotoksycznego idNK wobec komórek docelowych.

Wnioski:

SC działa na komórki idNK przede wszystkim poprzez regulację szlaku PDE-5/NO/cGMP, bez wpływu na ich funkcje angiogenne czy cytotoksyczne. Dane te wspierają hipotezę, zgodnie z którą efekty SC obserwowane u pacjentek z uRPL mogą wynikać przede wszystkim z jego wpływu na perfuzję maciczną i funkcję komórek doczesnowych, a nie z bezpośredniej modulacji angiogenezy czy aktywności cytotoksycznej idNK.

Publikacja 5

Kniotek M. Zych M, Roszczyk A, Szafarowska M, Jerzak MM, *Decreased Production of TNF- α and IL-6 Inflammatory Cytokines in Non-Pregnant Idiopathic RPL Women. Immunomodulatory Effect of Sildenafil Citrate on the Cellular Response of Idiopathic RPL Women, Journal of Clin Medicine 2021 Jul 15;10(14):3115*

Indywidualny wkład w powstanie publikacji określłam jako 60%. W pracy tej sformułowałam hipotezę badawczą, zdobyłam fundusze na badania, prowadziłam hodowlę komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells; PBMC) z SC oznaczałam odsetek komórek NKT, stężenia cytokin w supernatantach hodowlanych, analizowałam i interpretowałam wyniki wszystkich badań, przygotowałam manuskrypt, oraz złożyłam jego ostateczną wersję do czasopisma.

Celem badania była ocena wpływu SC na produkcję cytokin krwi obwodowej pacjentek z uRPL oraz zdrowych wieloródek oraz analiza populacji komórek regulatorowych Treg/Th17 i NKT . W pracy analizowano:

1. Stężenia cytokin pro- i przeciwzapalnych (TNF- α , IL-6, IL-2, IL-12p40, IL-4, IL-10, IL-17, IL-21, TGF- β , IFN- γ) w supernatantach 48-godzinnych hodowli PBMC stymulowanych PMA/jonomycyną $\pm$ SC.

2. Odsetek kluczowych populacji limfocytów uczestniczących w tolerancji immunologicznej:

- a. Th17 (CD4+CD25+IL-17A+),
- b. Treg (CD4+CD25++FOXP3+),
- c. NKT (CD3+CD56+CD44+CD161+).

Wyniki uzyskane w badaniu:

1. Profil cytokin u kobiet z uRPL świadczy o immunologicznym wyczerpaniu (*ang. immunological exhaustion*).

Stwierdzono istotnie:

• obniżoną produkcję cytokin prozapalnych TNF- α i IL-6 (załączniki: publikacja 5, Ryc.1, str. 6)

• podwyższone stężenia cytokin przeciwzapalnych TGF- β , (publikacja 5, Ryc.1, str. 7)

Wskazuje to na przesunięcie równowagi immunologicznej w kierunku nadmiernego profilu supresyjnego.

2. SC częściowo przywracał odpowiedź prozapalną PBMC pacjentek z uRPL.

Po 48-godzinnej ekspozycji PBMC na SC (400 ng/ml) obserwowano:

- wzrost stężenia TNF- α ,
- tendencję do zwiększenia wydzielania IL-6,
- zwiększenie wytwarzania IL-10, (publikacja 5, Ryc.3, str.8)

Oznacza to jednoczesną aktywację osi wczesnej odpowiedzi zapalnej i łagodzącą regulację immunologiczną.

3. SC moduluje równowagę Th17/Treg w kierunku populacji IL-17A⁺/FOXP3⁺ (tzw. „*plastic T cells*”).

4. Profil Treg/Th17 pacjentek z uRPL potwierdza zaburzenia regulacji immunologicznej. U kobiet z uRPL wykazano:

- wyższy odsetek Treg,
- niezmienny odsetek limfocytów Th17 (publikacja 5, Tab. 2, str. 9)

5. SC nie wpływa na populację komórek NKT.

Odsetek komórek NKT:

- nie różnił się pomiędzy pacjentkami a wieloródkami,
- nie ulegał zmianie po ekspozycji PBMC na SC (publikacja 5, Tab. 2, str. 10)

Na podstawie przeprowadzonych badań mogłam sformułować następujące wnioski:

- Kobiety z niewyjaśnionymi poronieniami nawracającymi wykazują cechy immunologicznego wyczerpania, przejawiające się obniżoną produkcją TNF- α i IL-6 oraz podwyższonym stężeniem cytokin przeciwzapalnych (TGF- β , IL-10). Profil ten może utrudniać wywołanie fizjologicznej, kontrolowanej odpowiedzi zapalnej niezbędnej w fazie implantacji.
- CS częściowo przywraca zdolność PBMC do odpowiedzi prozapalnej, zwiększając produkcję TNF- α , jednocześnie wzmacniając szlaki regulacyjne (IL-10). Wskazuje to

na immunomodulujące działanie SC, polegające na normalizacji odpowiedzi prozapalno-tolerogennej.

- SC zwiększa odsetek populacji $CD4^+CD25^+FOXP3^+IL-17A^+$, co świadczy o podwyższonej plastyczności limfocytów $CD4^+$. Komórki te łączą właściwości regulatorowe i efektorowe, a ich obecność w środowisku implantacyjnym może sprzyjać prawidłowej reakcji zapalno-tolerogennej.
- Podwyższony odsetek Treg w uRPL odzwierciedla przewlekłe pobudzenie osi supresyjnej, co jest zgodne z wysokim poziomem TGF- β . Zaburzenie równowagi Th17/Treg może być jedną z immunologicznych przyczyn uRPL.
- Brak zmian w populacji NKT sugeruje, że SC nie wpływa bezpośrednio na ten typ komórek, a różnice opisane w innych badaniach mogą dotyczyć środowiska endometrium, a nie krwi obwodowej.
- Zwiększona produkcja TNF- α po zastosowaniu SC może wspierać implantację, zgodnie z obserwacją, że prawidłowa, przejściowa odpowiedź zapalna w wczesnej ciąży jest konieczna dla tworzenia łożyska.

Wyniki moich badań, przedstawione w powyższych 4 pracach, sugerują wyciszenie układu odpornościowego w grupie badanych pacjentek z uRPL, co powiązałam ze zjawiskiem wyczerpania limfocytów i mechanizmem regulacji działania układu immunologicznego poprzez tzw. punkty kontroli immunologicznej (ang. *Immune Checkpoints*, ICPs), których ekspresja jest nasiloną na powierzchni limfocytów aktywowanych i tzw. wycieńczonych komórkach T (ang. *exhausted T cells*). ICPs są szeroko badane, opisywane i stosowane w immunoterapii nowotworów. Dlatego postanowiliśmy zbadać zmiany ekspresji ICPs u kobiet z uRPL.

Publikacja 6

Zych M, Roszczyk A, Dąbrowski F, Kniotek M, Zagożdżon R. Soluble Forms of Immune Checkpoints and Their Ligands as Potential Biomarkers in the Diagnosis of Recurrent Pregnancy Loss-A Preliminary Study. *Int J Mol Sci*. 2023 Dec 29;25(1):499. doi: 10.3390/ijms25010499. PMID: 38203670; PMCID: PMC10779235

Indywidualny wkład w powstanie publikacji oceniam na 30%: Byłam odpowiedzialna za sformułowanie hipotezy badawczej, analizę i interpretację wyników, przygotowanie

manuskryptu, jego poprawienie zgodnie z uwagami recenzentów, oraz złożenie ostatecznej wersji do czasopisma.

560

Celem pracy było oznaczenie stężeń rozpuszczalnych punktów kontroli immunologicznej (ang. *soluble immune checkpoints*, sICPs) w surowicy u trzech grup kobiet:

5631. - kobiet ciężarnych (n=20),

5642. - zdrowych wieloródek niebędących w ciąży (n=10),

5653. - pacjentek z uRPL (bezpośrednio po poronieniu) (n=20).

Punkty kontrolne układu odpornościowego (ICP) odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu równowagi funkcjonalnej komórek immunokompetentnych. Są to cząsteczki odpowiedzialne za regulację aktywności różnych populacji komórek układu odpornościowego. Do cząsteczek o działaniu hamującym zaliczają się m.in. PD-1/PD-L1 (cząsteczka programowanej śmierci, ang. *programmed death protein*), CTLA-4 (antygen cytotoksyczny limfocytów T, ang. *cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4*), TIM-3 (immunoglobulinowa i mucynowa cząsteczka zawarta w limfocycie T, typ 3; ang. *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*), VISTA (immunoglobulinowy supresor aktywacji limfocytów T w domenie V, ang. *V-domain Ig suppressor of T cell activation*) TIGIT (immunoreceptor limfocytów T z domenami immunoglobulinową i ITIM, ang. *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) oraz LAG-3 (gen aktywacji limfocytów typu 3, ang. *Lymphocyte Activation Gene-3*), jak i receptor dla TIM-3 ekspresowany przez trofoblast – Galektyna – 9 (Gal-9, ang. *Galectin-9*). Po związaniu ze swoimi ligandami, cząsteczki te przekazują sygnały hamujące do aktywowanych komórek, co prowadzi do indukcji stanu anergii lub szlaku apoptotycznego. Prawidłowe działanie cząsteczek hamujących aktywację układu immunologicznego chroni organizm przed nadmierną odpowiedzią na patogeny oraz zapobiega rozwojowi chorób autoimmunologicznych. Podobne mechanizmy regulacyjne są aktywowane w przebiegu fizjologicznej ciąży w stosunku do trofoblastu.

Wyniki uzyskane w badaniu:

W surowicy pacjentek z uRPL zaobserwowaliśmy:

1. Istotnie obniżone stężenia w porównaniu z wartościami oznaczonymi u kobiet ciężarnych:

• sGalectin-9,

• sTIM-3,

• sCD155 (ligand dla TIGIT),

2. Podwyższone stężenia:

- sLAG-3

LAG-3 jest ekspresjonowany m.in. na Treg i odgrywa kluczową rolę w indukcji tolerancji. Jego podwyższone stężenie może być zjawiskiem kompensacyjnym, odpowiadającym na niski poziom innych cząsteczek hamujących.

3. Poziomy sCD155:

- znacząco podwyższone u kobiet ciężarnych (co jest zgodne z fizjologicznym wyciszeniem cytotoxyczności w ciąży),
- sCD155 dla uRPL były zbliżone do wartości oznaczonych w surowicy wieloródek (załączniki: publikacja 6, Ryc.2-7, str. 5-7)

Wnioski przedstawione w publikacji:

- Pacjentki z uRPL wykazują charakterystyczne zaburzenia w profilach immunologicznych punktów kontrolnych, obejmujące obniżenie kluczowych sICPs odpowiedzialnych za tolerancję wczesnej ciąży (sTIM-3, sGal-9, sCD155).
- Najsilniejszym sygnałem deregulacji jest istotnie obniżony poziom sGal-9, cząsteczki produkowanej przez trofoblast i fibroblasty endometrium, która:
 - a. hamuje komórki NK,
 - b. wygasa odpowiedzi Th1 i CD8⁺,
 - c. wspiera indukcję IL-10 i TGF- β , co sprzyja rozwojowi Treg.

Jej niski poziom może wskazywać na niewystarczającą indukcję tolerancji macicznej.

- Niski poziom pary ICP Gal-9/TIM-3 są niekorzystne, ponieważ ich interakcja hamuje cytotoxyczność komórek NK, indukuje ekspresję IL-10 i TGF- β koniecznych do dojrzewania Treg, i wspiera eliminację limfocytów Th1 i CD8⁺.

Obniżenie Gal-9 i TIM-3 może odzwierciedlać upośledzoną regulację w interfazie maczyno-płodowej, sprzyjającą utracie ciąży.

- Obniżone poziomy ligandów dla TIM-3 i TIGIT sugerują, że u pacjentek z uRPL szlaki regulacji cytotoxyczności są słabiej aktywowane niż w fizjologicznej ciąży.
- Podwyższone stężenie sLAG-3 u kobiet z uRPL może stanowić mechanizm kompensacyjny w odpowiedzi na spadek innych sICPs.
- Upośledzenie regulacji ekspresji punktów kontroli immunologicznej może przyczyniać się do patologicznej aktywacji komórek NK/NKT oraz braku właściwej odpowiedzi tolerogenicznej, co potencjalnie przyczynia się do nawracających poronień.

Publikacja7

Zych, M., Kniotek, M., Roszczyk, A., Dąbrowski, F., Jędra, R., Zagożdżon, R. (2024). *Surface Immune Checkpoints as Potential Biomarkers in Physiological Pregnancy and Recurrent Pregnancy Loss. International Journal of Molecular Sciences*, (2024)25(17), 9378.

Indywidualny wkład w powstanie publikacji oceniam na 35%: Byłam odpowiedzialna za analizę i interpretację wyników, przygotowanie manuskryptu, poprawienie manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów, oraz złożenie jego ostatecznej wersji do czasopisma.

Celem pracy było określenie ekspresji ICPs na kluczowych populacjach limfocytów u pacjentek z uRPL do 72 godzin od utraty ciąży. Analizowane populacje obejmowały:

- limfocyty T ($CD3^+CD4^+$ oraz $CD3^+CD8^+$),
- limfocyty Th ($CD3^+CD4^+$),
- limfocyty Tc ($CD3^+CD8^+$),
- limfocyty regulatorowe Treg ($CD4^+CD25^{++}CD127^{low}$),
- komórki NK ($CD3^-CD16^+CD56^{+/-}$),
- komórki NKT ($CD3^+CD16^+CD56^{+/-}$).

Ekspresję ICPs oznaczano metodą cytometrii przepływowej.

ICPs limfocytów modulują aktywację i funkcję komórek poprzez hamowanie szlaków cytotoksycznych, indukcję tolerancji oraz wsparcie powstawania komórek regulatorowych. W kontekście ciąży kluczowe znaczenie mają m.in.:

PD-1, zapewniający wygaszanie nadmiernej odpowiedzi Th1 i cytotoksycznej $CD8^+$,
LAG-3, silnie związany z aktywnością supresyjną Treg,
TIM-3, którego ligandem jest trofoblastowa Galektyna-9,
TIGIT, kontrolujący aktywację komórek NK i NKT,
VISTA, działająca podobnie do PD-1 i CTLA-4.

Prawidłowe funkcjonowanie tych szlaków jest niezbędne dla tolerancji immunologicznej matki wobec pół-allogenicznego płodu.

Uzyskane wyniki przedstawione w publikacji:

1. Ekspresja PD-1 i LAG-3 była istotnie obniżona na komórkach pacjentek z uRPL

Spadek ekspresji PD-1 i LAG-3 zaobserwowano w większości badanych populacji limfocytów, szczególnie:

- a. na limfocytach T $CD4^+$ i $CD8^+$,

- b. na Treg,
- c. na komórkach NK oraz NKT.

Zjawisko to jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami literaturowymi wskazującymi, że u kobiet z uRPL obniżona jest ekspresja PD-L1 w doczesnej (zał. publikacja 7, Ryc. 1 oraz Ryc. 3, str. 7 i 9).

2. Ekspresja TIM-3 była obniżona na limfocytach Treg, Th, Tc oraz komórkach NK (zał. publikacja 7, Ryc. 2, str.8).

3. TIGIT – zróżnicowany wzór ekspresji (zał. Publikacja 7, Ryc. 4, str. 10)

- a. podwyższona ekspresja TIGIT na komórkach NK i NKT,
- b. obniżona ekspresja TIGIT na limfocytach T (CD4⁺, CD8⁺) i Treg.

4. Ekspresja VISTA była podwyższona na komórkach NK (zał. Publikacja 7, Ryc. 5, str. 11)

Wnioski wynikające z powyższych badań:

- Pacjentki z uRPL wykazują zaburzenia ekspresji membranowych punktów kontroli immunologicznej na limfocytach T, Treg, oraz na komórkach NK i NKT — odmienną od wzorca fizjologicznej ciąży. Szczególnie istotne jest obniżenie ekspresji PD-1, TIM-3 i LAG-3, kluczowych dla wygaszania odpowiedzi cytotoksycznej, redukcji aktywności Th1, oraz proliferacji i przeżycia Treg.
- Niska ekspresja PD-1/PD-L1 może prowadzić do niewystarczającego wygaszania odpowiedzi Th1, zwiększonej cytotoksyczności wobec komórek trofoblastu, oraz utraty tolerancji na granicy maczyno-płodowej.
- TIM-3 jest kluczowy dla hamowania cytotoksyczności komórek NK oraz eliminacji limfocytów Th1. Jego obniżona ekspresja może zaburzać sygnalizację tolerogenną TIM-3/Gal-9, produkcję IL-10 i TGF-β, jak również dojrzewanie i funkcję Treg. Jest to zgodne z wynikami badania sICPs, gdzie wykazaliśmy znacznie obniżone poziomy rozpuszczalnych TIM-3 oraz Gal-9 w surowicy pacjentek z uRPL.
- W fizjologicznej ciąży LAG-3⁺ Treg są szczególnie licznie obecne w doczesnej i wykazują silną aktywność supresyjną. Obniżony odsetek LAG-3⁺ Treg u pacjentek z uRPL może prowadzić do niewystarczającej ochrony płodu przed cytotoksycznością limfocytów CD8⁺.
- Zwiększenie ekspresji TIGIT na NK/NKT może powodować ich nadmierną supresję w obecności ligandu CD155. Uwzględniając wcześniejsze wyniki sICPs u pacjentek z uRPL (niższy poziom sCD155 niż u ciężarnych), można przypuszczać, że szlak TIGIT nie jest

690 prawidłowo równoważony i może dochodzić do nieprawidłowego hamowania
691 cytotoksyczności.

- 692 • Wzrost ekspresji VISTA, cząsteczki o działaniu zbliżonym do PD-1 i CTLA-4, może
693 dodatkowo hamować aktywność komórek NK, obniżać produkcję cytokin
694 prozapalnych, i zaburzać remodeling naczyń spiralnych w wczesnej ciąży.

696 Podsumowanie wyników prac z cyklu

697 Wyniki całej serii badań pozwalają sformułować następujące syntetyczne wnioski:

698 1. SC moduluje odpowiedź zapalną u kobiet z uRPL

699 W kilku badaniach wykazano, że kobiety z uRPL mają obniżone stężenia cytokin prozapalnych
700 (TNF- α , IL-6) oraz jednoczesny wzrost cytokin przeciwzapalnych (TGF- β , IL-10) — co
701 wskazuje na obraz wyciszenia (*exhaustion*) układu immunologicznego.

702 2. SC działa immunostymulująco, przywracając częściowo fizjologiczną reakcję 703 zapalną:

- 704 ○ zwiększa poziom TNF- α , co jest zgodne z koncepcją, że wczesna
705 implantacja wymaga przejściowego stanu zapalnego,
- 706 ○ podwyższa stężenie IL-10, wspierając rozwój Treg i regulację odpowiedzi
707 immunologicznej.

708 3. SC wpływa na równowagę limfocytów T (Th17/Treg)

- 709 • Kobiety z uRPL mają podwyższony odsetek Treg, ale ich funkcja może
710 być zaburzona.

- 711 • Po stymulacji SC zaobserwowano istotny wzrost populacji komórek
712 podwójnie dodatnich IL-17+FOXP3+ (Th17/Treg “plastycznych”; ang. *plasticic*).
713 Wskazuje to na możliwość aktywacji komórek przejściowych, co może być elementem
714 przywracania równowagi między odpowiedzią pro- a przeciwzapalną.

715 4. SC moduluje działanie komórek NK, w tym idNK

- 716 • W badaniu idNK wykazano:
 - 717 ○ obniżenie ekspresji PDE5A po hodowli z SC — szczególnie
718 wyraźne u kobiet z uRPL,
 - 719 ○ brak wpływu SC na aktywność cytotoksyczną idNK,
 - 720 ○ brak wpływu na ekspresję angiogennych czynników VEGF-A,
721 PlGF, RENB i IL-8.

722 5. SC nie wpływa na odsetek komórek NKT

• W przeciwieństwie do danych literaturowych, w badanej populacji nie stwierdzono:

- różnic w odsetku komórek NKT między pacjentkami a kontrolą,
- wpływu SC na populację NKT w PBMC.

6. SC częściowo naśladuje działanie etanerceptu w zakresie regulacji TNF- α

• W badaniu porównawczym wykazano:

- etanercept istotnie obniżał poziom TNF- α ,
- SC podwyższał poziom TNF- α u pacjentek z uRPL z początkowo niską produkcją tej cytokiny, wyrównując jej poziom do wartości obserwowanych u pacjentek po terapii biologicznej.

7. W połączeniu z wcześniejszymi badaniami nad sICPs i cytokinami, uzyskane wyniki wskazują, że uRPL charakteryzuje się:

- a. niedostateczną aktywacją szlaków tolerogennych (PD-1/PD-L1, TIM-3/Gal-9, LAG-3),
- b. nieprawidłową regulacją aktywności komórek NK (TIGIT, VISTA),
- c. dysfunkcją Treg.

Cykl moich prac badawczych obejmuje wieloletnie, złożone analizy wpływu SC na układ immunologiczny kobiet z uRPL. Łącznie publikacje te opisują działania SC na poziomie cytokin, komórek NK i idNK, limfocytów T (Th17, Treg), czynników angiogennych, oraz ekspresji PDE5A, a także zestawiają jego efekt z działaniem biologicznego anty-TNF – etanerceptu. Wyniki uzyskane w ramach projektu badawczego i opublikowane w opisanych pracach sugerują immunomodulujący wpływ SC poprzez oddziaływanie na uwalnianie TNF- α oraz IL-10, jak również poprzez edukację i dojrzewanie komórek idNK (zmiany w koekspresji receptorów NKG2A/ KIR2DL1). Moje badania wykazały, iż przebadane pacjentki z nawracającymi poronieniami prawdopodobnie w efekcie kolejnych poronień utrwalają silną przeciwwzapalną odpowiedź organizmu, na co wskazują podwyższone odsetki Treg na obwodzie czy TGF- β , a także zaburzenie interakcji punktów kontrolnych i ich ligandów: PD-1/PD-L1, TIM-3/Gal-9, LAG-3.

Podwyższenie poziomu TNF- α po podaniu SC może mieć korzystny wpływ na początkowe etapy rozwoju ciąży, w szczególności na implantację zarodka i zrównoważenie zaburzeń aktywacji komórek NK przy obserwowanym zaburzeniu ekspresji TIGIT i VISTA na komórkach cytotoksycznych. Blokowanie samej aktywności enzymu PDE5-A przez SC obniżyło ekspresję genów dla tego enzymu w przypadku pacjentek z uRPL. Dane te wskazują,

że idNK u kobiet z uRPL są bardziej wrażliwe na blokadę PDE5A, ale SC nie aktywuje ich cytotoksyczności, co jest korzystne z punktu widzenia implantacji. Zmniejszona ekspresja VEGF-A i PlGF w uRPL potwierdziła wcześniejsze obserwacje. SC nie modyfikował szlaków angiogennych, co sugeruje, że jego działanie w przypadku pacjentek z uRPL odbywa się głównie poprzez modulację układu immunologicznego, a nie angiogenezy. Zmniejszona ekspresja PDE5-A może nasilać pozytywny efekt działania SC (poprzez nagromadzenie cGMP w środowisku endometrium). Hamowanie katabolizmu cGMP przez selektywne inhibitory PDE5 zwiększa poziom NO, a przez to wpływa pozytywnie na przepływ krwi w tętnicach macicznych i wzrost endometrium.

Należy podkreślić, że efekt działania SC był zależny od rodzaju bodźca aktywującego limfocyty, co sugeruje, iż w warunkach klinicznych skuteczność immunomodulacyjna leku może być zróżnicowana w zależności od dominujących mechanizmów aktywacji układu odpornościowego u danej pacjentki. Z tego powodu niezbędne są badania translacyjne spersonalizowane obejmujące populacje kobiet z uRPL i uIF, w których ocenie podlegałyby zarówno profil cytokinowy, jak i efekty kliniczne ewentualnej terapii z wykorzystaniem inhibitorów PDE-5. SC nie jest lekiem prozapalnym ani przeciwzapalnym, lecz regulatorem, który w warunkach immunologicznego wyciszenia charakterystycznego dla części kobiet z uRPL może pomóc w odtworzeniu warunków sprzyjających implantacji i wczesnej ciąży.

Ponadto wyniki oceny punktów kontroli odpowiedzi immunologicznej sugerują, iż zmiany obserwowane w stężeniach sGalectin-9, sTIM-3, sLAG-3, sCD155 oraz ekspresji TIGIT, LAG-3, i VISTA u kobiet z uRPL, są związane z zaburzeniami aktywacji komórek Treg jak i cytotoksycznych NK/NKT/Tc. ICPs mogą służyć jako biologiczne markery wczesnej utraty ciąży, a w przyszłości posłużyć jako cele terapeutyczne w leczeniu nawracających strat ciąży.

Dalsze badania mechanistyczne i kliniczne, w tym analizy interakcji między różnymi punktami kontroli, subpopulacjami limfocytów oraz wpływem egzosomów i czynników środowiskowych na tolerancję immunologiczną u pacjentek z uRPL, w celu zaproponowania nowych narzędzi diagnostycznych dla pacjentek, a także planowania immunoterapii uRPL oraz personalizacji leczenia, będą prowadzić w ramach projektu Europejskiego Partnerstwa na rzecz Spersonalizowanej Medycyny, **JTC 2024 PerMed, pt.: „Personalizacja leczenia niepłodności kobiecej i nawracających poronień o nieznanej etiologii”**.

1. Ohams M, Jerzak M., Górski A Effects of sildenafil citrate and etanercept treatment on TNF- α levels in peripheral blood of women with recurrent miscarriage, *Ginekologia polska*, 2015, (86)7 : 520-4. doi:10.17772/gp/57823
2. Wilczyński J. Postępowanie w poronieniach nawracających. *Ginekol Po Dyplomie*. 2017;19(3):62–66.
3. Kniotek M, Roszczyk A, Zych M, Szafarowska M, Jerzak M, Differences in the Expression of KIR, ILT Inhibitory Receptors, and VEGF Production in the Induced Decidual NK Cell Cultures of Fertile and RPL Women, *Biomed Res Int*. 2021 May 4;2021:6673427.
4. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;98(5):1103–11.
5. ESHRE Guideline Group on RPL. (2023). *ESHRE guideline: Recurrent pregnancy loss: An update in 2022*. *Human Reproduction Open*, 2023(1), hoad002.T
6. Kniotek M, Zych M, Roszczyk A, Szafarowska M, Jerzak MM, Decreased Production of TNF- α and IL-6 Inflammatory Cytokines in Non-Pregnant Idiopathic RPL Women. Immunomodulatory Effect of Sildenafil Citrate on the Cellular Response of Idiopathic RPL Women, *Journal of Clin Medicine* 2021 Jul 15;10(14):3115
7. Hallah Alanazi, Yuan Zhang, Joy Fatunbi, Than Luu, Joanne Kwak-Kim, The impact of reproductive hormones on T cell immunity; normal and assisted reproductive cycles, *Journal of Reproductive Immunology*, Volume 165 ,2024, 104295, ISSN 0165-0378.
8. Sher, G., & Fisch, J. D. (2002). Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertility and sterility*, 78(5), 1073–1076. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03375-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03375-7)
9. Jerzak, M., Kniotek, M., Mrozek, J., Górski, A., & Baranowski, W. (2008). Sildenafil citrate decreased natural killer cell activity and enhanced chance of successful pregnancy in women with a history of recurrent miscarriage. *Fertility and sterility*, 90(5), 1848–1853.
10. Kniotek M, Boguska A. Sildenafil Can Affect Innate and Adaptive Immune System in Both Experimental Animals and Patients, *Journal of Immunology Research*, 20174541958. <https://doi.org/10.1155/2017/4541958>
11. Wareing M, Myers JE, O'Hara M, Baker PN. Sildenafil citrate (Viagra) enhances vasodilation in fetal growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2550–2555.
12. Dreisler E, Kjer JJ. Asherman's syndrome: current perspectives on diagnosis and management. *Int J Womens Health*. 2019 Mar 20; 11:191-198.
13. Sharp A, Cornforth C, Jackson R, et al. Maternal sildenafil for severe fetal growth restriction (STRIDER): a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet Child Adolesc Health*. 2018;2(2):93–102.
14. Ganzevoort W, Alfirevic Z, von Dadelszen P, Kenny LC, Papageorgiou AT. STRIDER: sildenafil therapy in dismal prognosis early-onset intrauterine growth restriction—a protocol for a systematic review with individual participant data and aggregate data meta-analysis and trial sequential analysis. *Syst Rev*. 2014;3:23.
15. Karakhanova S, Yang Y, Link J, Soltek S, von Ahn K, Umansky V, et al. Gender-specific immunological effects of the phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil in healthy mice. *Mol Immunol*. 2013 Dec;56(4):649–59.
16. Serafini P, Mehnert JM, Buque A, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments antitumor immunity by reprogramming suppressive myeloid cells. *J Clin Invest*. 2006;116(8):2464–71.
17. Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, Lo A, Husain Z, Thadhani RI, et al. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol*. 2013 Apr 15;190(8):3939–48.
18. Xu X, Zhao X, Chen L, Liu M, Hu Z, Ke J, Fu B, Zhou Y, Wei H. CD158a/CD158b NK cell imbalance correlates with hypertension in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2022 May; 87(5):E13532.

19. Shreeve N, Depierreux D, Hawkes D, Traherne JA, Sovio U, Huhn O, et al. The CD94/NKG2A inhibitory receptor educates uterine NK cells to optimize pregnancy outcomes in humans and mice. *Immunity*. 2021 Jun 8;54(6):1231–44.e4.
20. Von WE, Nikolaou D, MacLaran K, Norman-Taylor J, Bhagwat P, Cuff AO, et al. Uterine NK cells underexpression KIR2DL1/S1 and LILRB1 in reproductive failure. *Front Immunol*. 2023 Jan 13;13:1090029.
21. Kim M, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR, et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO Mol Med*. 2013 Sep;5(9):1415–30.
22. Tóth E, Györfy D, Posta M, Hupuczi P, Balogh A, Szalai G, et al. Decreased expression of placental proteins in recurrent pregnancy loss: functional relevance and diagnostic value. *Int J Mol Sci*. 2024 Feb 3;25(3):1865.
23. Nejabati HR, Latifi Z, Ghasemnejad T, Fattahi A, Nouri M. Placental growth factor (PlGF) as an angiogenic/inflammatory switcher: lesson from early pregnancy losses. *Gynecol Endocrinol*. 2017 Sep;33(9):668–74.
24. Satorres E, Martínez-Varea A, Diago-Almela V. sFlt-1/PlGF ratio as a predictor of pregnancy outcomes in twin pregnancies: a systematic review. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2023 Dec;36(2):2230514.
25. Lash GE, Scherjon SA, Innes BA, et al. Expression of placental growth factor by uterine natural killer cells and its role in angiogenesis during early pregnancy. *J Immunol*. 2010;185(6):3658–3666.
26. Brosnihan KB, et al. Local uteroplacental renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(8):1255–1262.
27. Vilotić A, Nacka-Aleksić M, Pirković A, Bojić-Trbojević Ž, Dekanski D, Jovanović Krivokuća M. IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 23;23(23):14574. doi: 10.3390/ijms232314574. PMID: 36498901; PMCID: PMC9738067.
28. Cifone MG, Ulisse S, Santoni A. Natural killer cells and nitric oxide. *Int Immunopharmacol*. 2001 Aug;1(8):1513–24.
29. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell*. 2015;161(2):205–14.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1. Współpraca międzynarodowa

- 2024 - 2027 - Kierownik polskiej grupy badawczej w międzynarodowym projekcie Europejskiego Partnerstwa na rzecz Spersonalizowanej Medycyny, JTC 2024 PerMed, pt. "Personalizacja leczenia niepłodności kobiecej i nawracających poronień o nieznanej etiologii" (Personalisation of Treatment for Female Infertility and Recurrent Pregnancy Loss of Unknown Etiology, PerFet)

<https://www.eppermed.eu/funding-projects/projects-results/project-database/perfert/>

nr wniosku: EPPERMED2024-584, (kod projektu WUM: EUR12, akronim PerFet)

Budżet beneficjenta, WUM = 1 510 767,02 PLN

Całkowity budżet projektu = 5 391 706,83 PLN

Projekt realizowany jest przez konsorcjum pięciu partnerów, w tym 4 instytucji zagranicznych: Centrum Innowacyjnej Medycyny oraz JSC Nanodiagnostyka Wilno, Litwa; University College Dublin (UCD) w Irlandii oraz Szpital Uniwersytecki Careggi (Careggi University Hospital, CUH) we Florencji (Włochy). Dzięki tej współpracy w moich badaniach mogę korzystać z dostępu do unikalnych zasobów badawczych i klinicznych partnerów zagranicznych. Współpraca ma charakter multidyscyplinarny i obejmuje integrację doświadczenia klinicznego, badań podstawowych oraz innowacyjnych rozwiązań technologicznych.

W ramach projektu grupa badawcza z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod moim kierownictwem, przeprowadzi oznaczenia markerów immunologicznego zapalenia zlokalizowanych na powierzchni limfocytów krwi obwodowej oraz menstruacyjnej, jak i markerów rozpuszczalnych z surowicy krwi obwodowej i menstruacyjnej. Ponadto zostaną wyizolowane komórki macierzyste pochodzące z krwi menstruacyjnej (MenSC) od zdrowych kobiet wieloródek, kobiet z nawracającymi poronieniami oraz niewyjaśnioną niepłodnością w celu scharakteryzowania różnic metabolicznych i funkcjonalnych MenSC oraz różnic w produkcji EVs. MenSC izolowane od zdrowych kobiet posłużą także do pozyskania specyficznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) o właściwościach immunoregulacyjnych. EVs wyizolowane z hodowli MenSC będą wykorzystywane do modulacji odpowiedzi immunologicznej pacjentek z idiopatyczną nawracającą utratą ciąży (uRPL) lub idiopatyczną niepłodnością (uIF) w badaniach *in vitro*.

Projekt zakłada realizację następujących celów badawczych:

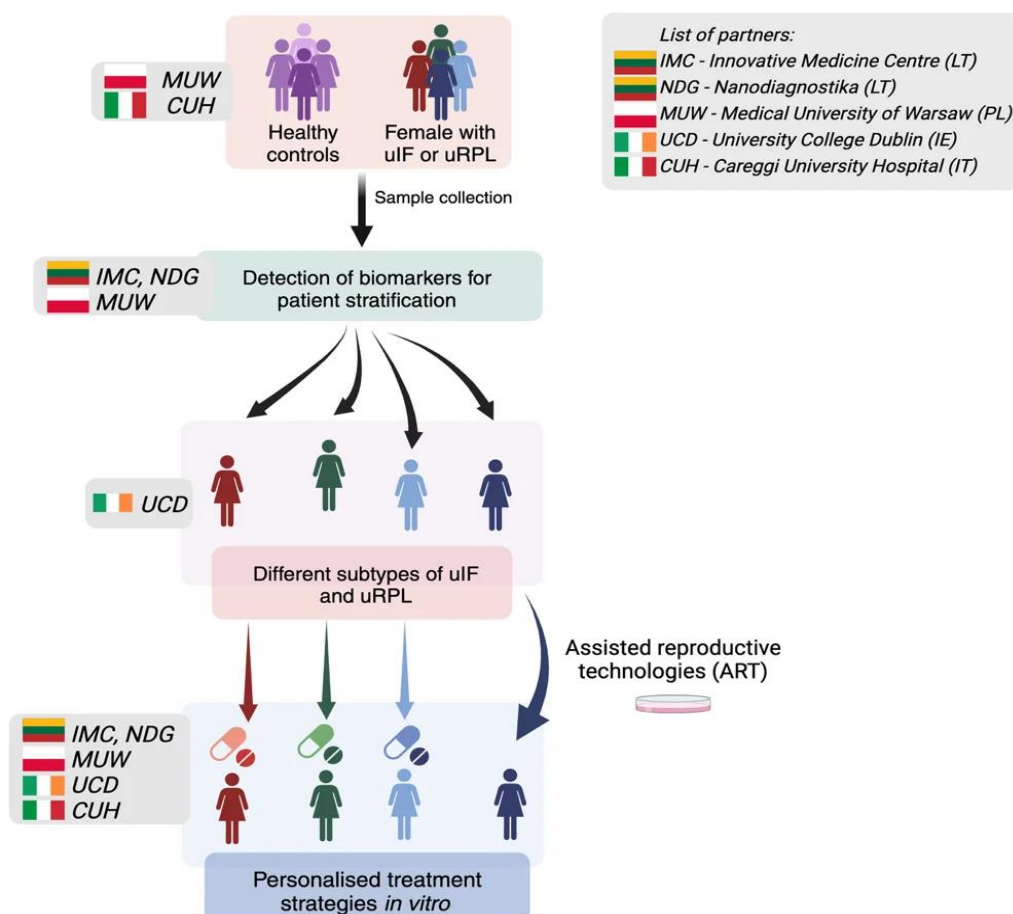
- identyfikacja charakterystycznego zestawu zmienionych biomarkerów dla pacjentek z grup uIF i uRPL dzięki porównaniu z płodnymi, zdrowymi kobietami;

- stratyfikacja pacjentek na grupy ze względu na ekspresowane biomarkery na pacjentki z zaburzeniami immunologicznymi, metabolicznymi, i adhezyjnymi;

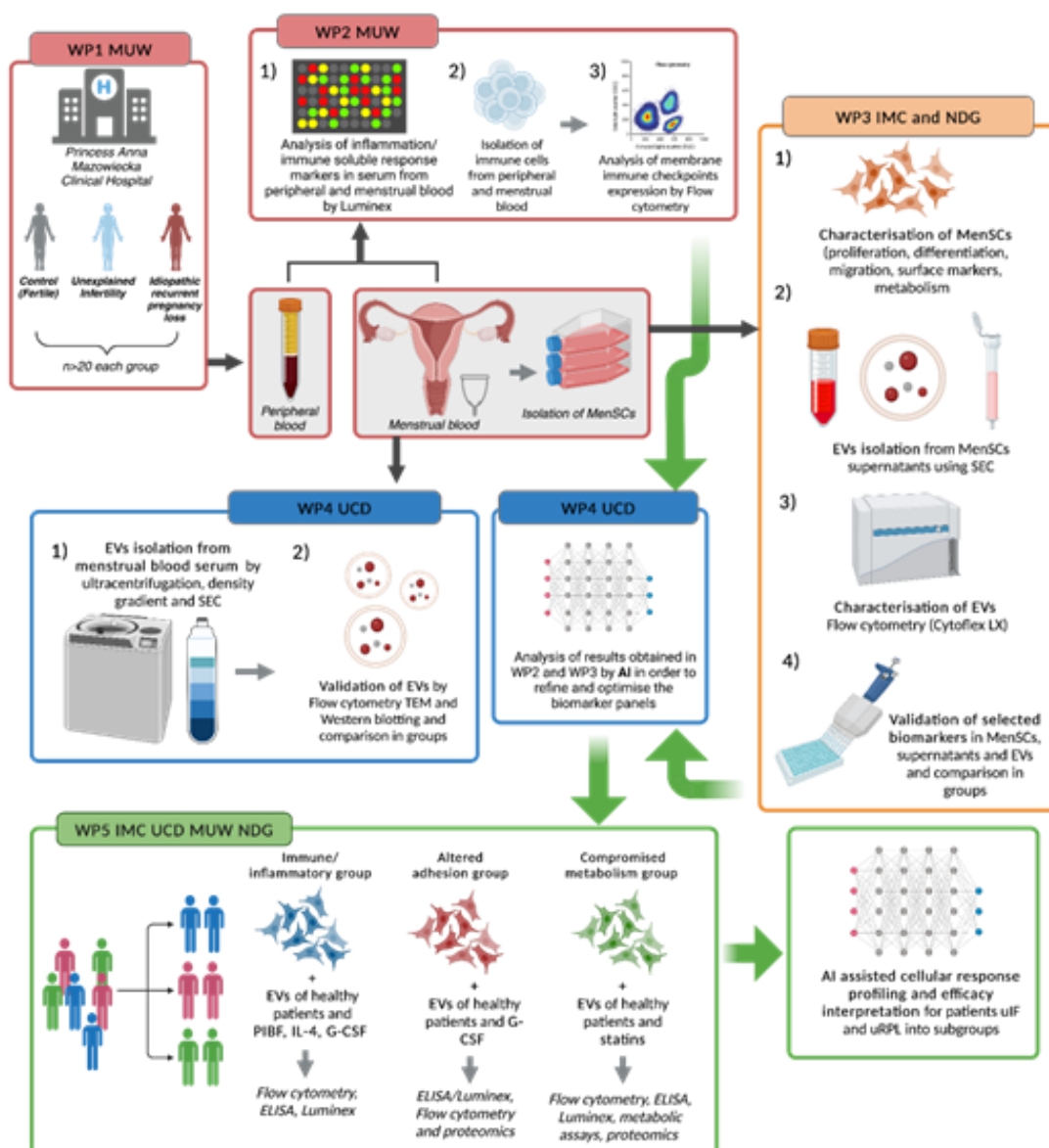
- analiza działania statyn u pacjentek z zaburzeniami metabolizmu komórkowego, w kontekście przywracania zmienionego fenotypu MenSC oraz limfocytów T (LT) w warunkach *in vitro*.

- ocena potencjału terapeutycznego EVs, IL-4, G-CSF oraz PIBF u pacjentek z zaburzeniami immunologicznymi i adhezyjnymi,

Założony wynik projektu to określenie charakterystycznych biomarkerów dla każdej z grup pacjentek oraz opracowanie spersonalizowanych strategii interwencji terapeutycznych.



Ryc.1. Schematyczne przedstawienie celów i zadań poszczególnych partnerów w projekcie PerFet.



Ryc.2. Schematyczne przedstawienie planu badawczego w projekcie PerFet, (PerMed 2024).

Pozostałe współprace międzynarodowe:

- UK, Essex University - Egzaminator zewnętrzny (External Examiner) w dniu 12 maja 2020 na egzaminie “Viva” oceniałam pracę doktorską dr. n. med. Bandera Khayata pt. “The recognition of lipopolysaccharides present in Gram-negative bacteria by receptors of the immune system”, przygotowaną w Zakładzie Nauk Biologicznych (Biological Sciences Department) na Uniwersytecie w Essex (Colchester, Wielka Brytania).

- XIX Międzynarodowy Warszawski Kongres Medyczny, WIC, 12–14 kwietnia 2024 r. - recenzent naukowy przesłanych abstraktów, selekcja prac do sesji naukowych.
- Oceniający plakaty naukowe w ramach sesji tematycznych “*Manipulation of tolerance*” oraz “*Mechanisms of atopic disease*” podczas VII Europejskiego Kongresu Immunologii (ECI 2024) w Dublinie, Irlandia.
- Gościnny redaktor specjalnego numeru czasopisma *International Journal of Molecular Sciences*, wydawnictwo MDPI, poświęconego tematyce “*Research Advances in Reproductive Immunology*”. Pełnię tę funkcję od 29 sierpnia 2024 r., odpowiadając za merytoryczną ocenę i koordynację publikacji w zakresie immunologii rozrodu.
https://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/NU70AAJ8HB)
- Członek Komitetu Organizacyjnego konferencji Immunology & Vaccinology, Cognition Conferences, 25-26.11.2024, Zurich, Szwajcaria
- Członek stowarzyszeń międzynarodowych i krajowych, działających we współpracy ze stowarzyszeniami międzynarodowymi:
 IFFS – International Federation of Fertility Societies – Międzynarodowa Federacja Stowarzyszeń na rzecz Płodności
 ESHRE - European Society of Human Reproduction and Embryology – Europejskie Stowarzyszenie na rzecz Ludzkiej Reprodukacji oraz Embriologii
 BFC - Baltic Society of Flow Cytometry - Bałtyckie Stowarzyszenie Cytometrii Przepływowej
 ESCCA – European Society of Clinical Cell Analyses - Europejskie Stowarzyszenie Klinicznej Analizy Komórek (cytometria przepływowa)
 PTIKiD – Polskie Towarzystwo Immunologii Klinicznej i Doświadczalnej

5.2. Istotna aktywność naukowa na innych uczelniach:

Od początku pracy w Zakładzie Immunologii Klinicznej WUM współpracowałam z Laboratorium Bakteriofagowym IITD PAN Wrocław, prowadziłam badania interakcji bakteriofagów z układem immunologicznym. Współpraca zakończona była licznymi publikacjami i doniesieniami zjazdowymi oraz monografiami:

1. Górski A, Nowaczyk M, Weber-Dąbrowska B, **Kniotek M**, Boratyński J, Ahmed A, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Światała-Jeleń K, Opolski A, ***New insights into the possible role of bacteriophages in transplantation***, *Transplant Proc.* 2003 Sep;35(6):2372-3

Artykuł przedstawia nową hipotezę na potencjalną rolę bakteriofagów (wirusów atakujących bakterie) w kontekście transplantologii. Bakteriofagi mogą nie tylko zwalczać infekcje bakteryjne, które często stanowią powikłania po przeszczepach, ale również mogą wpływać na układ odpornościowy biorcy. Rozważamy ich potencjalną rolę w immunomodulacji oraz zmniejszaniu ryzyka odrzucania przeszczepu. Choć badania są wstępne, wyniki wskazują na możliwość wykorzystania fagoterapii jako uzupełnienia lub alternatywy dla klasycznych metod przeciwdziałania infekcjom i procesom odrzucania przeszczepu w transplantologii.

2. **Kniotek M**, Beata Weber-Dąbrowska, Krystyna Dąbrowska, Katarzyna Świtła-Jeleń, Jan Boratyński, Mariusz Wiszniowski, Ireneusz Glinkowski, Iwona Babiak, Andrzej Górecki, Michał Nowaczyk, Andrzej Górski, **Phages as Immunomodulators of Antibody Production**, *Genomic Issues, Immune System Activation and Allergy (Immunology 2004)*, Medimond, 2004, s. 33–37.

Celem mojej pracy była ocena potencjalnych właściwości immunomodulacyjnych fagów, ze szczególnym uwzględnieniem ich wpływu na produkcję przeciwciał.

W badaniach, które przeprowadziłam metodą *Plaque Forming Cells* (technika Jerne’a)– wykrywanie limfocytów B produkujących przeciwciała wykazałam, iż fagi *Escherichia coli* (T4 i HAP-1) oraz *Pseudomonas* (PsF) hamują produkcję przeciwciał typu IgG *in vitro* w hodowlach PBMCs w reakcji MLR przeprowadzonej na komórkach izolowanych od zdrowych dawców krwi.

Natomiast podawanie bakteriofagów *Staphylococcus aureus* (A5) pacjentom z przewlekłym zapaleniem kości (osteomyelitis), występującym jako powikłanie pooperacyjne w ortopedii, prowadziło do statystycznie istotnego wzrostu poziomu przeciwciał, w porównaniu do wartości wyjściowych mierzonych przed rozpoczęciem leczenia fagami. Zmiany te sugerują, że fagi mogą pełnić funkcję biologicznych modulatorów odpowiedzi humoralnej. Efekt ten był obserwowany niezależnie od pierwotnej etiologii zakażenia kostnego, co może wskazywać na mechanizm działania wykraczający poza bezpośrednie działanie przeciwdrobnoustrojowe. Podwyższony poziom przeciwciał może świadczyć zarówno o bezpośredniej stymulacji układu odpornościowego przez elementy strukturalne fagów, jak i o ich wpływie na mikrobiom jelitowy oraz tzw. oś jelito–układ odpornościowy.

3. **Kniotek M.**, Ahmed A.M.A., Dąbrowska K., Świtała-Jeleń K., Opolski A., Górski A.

Bacteriophage Interactions with T Cells and Platelets

Tytuł rozdziału: *Bacteriophage Interactions with T Cells and Platelets, Cytokine Network, Regulatory Cells Signalling, and Apoptosis (Immunology)*, Monduzzi Editore, 2004, s. 189–19

W centrum koncepcji pracy znajduje się motyw **KGD** (Lizyna–Glicyna–Kwas asparaginowy), obecny w białku gp24 kapsydu bakteriofaga T4. Udowodniłam, iż, motyw ten może oddziaływać z integryną **α IIb β 3**, występującą w dużej ilości na powierzchni płytek krwi oraz na aktywowanych limfocytach T. W przypadku płytek krwi możliwe było blokowanie miejsc wiążących fibrynogen, co hamuje ich agregację i zmienia przebieg reakcji zakrzepowych. W odniesieniu do aktywowanych limfocytów T, przyłączenie faga do integryny **α IIb β 3** może wpływać na ich mobilność, zdolność do migracji, a nawet prowadzić do ich usuwania z krążenia przez mechanizmy zależne od układu siateczkowo-śródbłonkowego. Właściwości blokowania integryn β 3 mogą być teoretycznie wykorzystane w medycynie, np. do hamowania procesów adhezji komórek nowotworowych czy modyfikowania reakcji immunologicznych. Szczególne możliwości wiązania się bakteriofagów z aktywowanymi limfocytami T mogłyby modulować nadmierne odpowiedzi zapalne lub autoimmunologiczne.

4. Górski A, **Kniotek M**, Perkowska-Ptasińska A, Mróz A, Przerwa A, Gorczyca W, Dąbrowska K, Weber-Dąbrowska B, Nowaczyk M, ***Bacteriophages and transplantation tolerance***, *Transplant Proc.* 2006 Jan-Feb;38(1):331-3

Artykuł przeglądowy omawia potencjalną rolę bakteriofagów w promowaniu tolerancji przeszczepu. Fagi mogą działać immunomodulująco – zmniejszać aktywację limfocytów T i produkcję cytokin prozapalnych, co może sprzyjać tolerancji wobec przeszczepionego narządu. W pracy tej zwracamy uwagę na możliwość wykorzystania fagów jako elementu wspomagającego terapię immunosupresyjną w transplantologii.

5. Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, **Ohams M**, Korczak-Kowalska G, Olszowska-Zaremba N, Łusiak-Szelachowska M, Kłak M, Jończyk E, Kaniuga E, Gołaś A, Purchla S, Weber-Dąbrowska B, Letkiewicz S, Fortuna W, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłosowska D. ***Phage as a modulator of***

immune responses: practical implications for phage therapy, Adv Virus Res.
2012;83:41-71

Publikacja podsumowuje dane eksperymentalne oraz kliniczne dotyczące wpływu bakteriofagów na układ odpornościowy człowieka oraz przedstawia praktyczne zastosowania w kontekście terapii fagowej. Opisane poniżej wnioski przeprowadzono na podstawie badań pacjentów leczonych preparatami bakteriofagowymi. Porównywałam odpowiedź immunologiczną pacjentów przed terapią fagową, a następnie po 7, 14, 21, 40-60 dniach, w tym fenotyp limfocytów, odsetek limfocytów CD3⁺, NK (CD3⁻CD16⁺/CD56⁺), oraz CD3⁺CD56⁺ oraz aktywność komórek NK. Po terapii obserwowałam wzrost liczby pacjentów z prawidłową aktywnością cytotoksyczną komórek NK, co sugeruje poprawę funkcjonowania nieswoistej odpowiedzi przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej układu odpornościowego. Efekty te mogą świadczyć o normalizacji aktywności immunologicznej pod wpływem terapii fagowej, bez jej nadmiernej stymulacji, co jest istotne w kontekście bezpieczeństwa stosowania fagów jako potencjalnych immunomodulatorów.

5. Górski A, Międzybrodzki R, Jończyk-Matysiak E, **Kniotek M**, Letkiewicz S. *Therapeutic Phages as Modulators of the Immune Response, Practical Implications. Clin Infect Dis.* 2023 Nov 2;77(Suppl 5): S433-S439.

Praca przedstawia najnowsze badania nad fagami. Ze względu na narastającą oporność na antybiotyki, przeciwbakteryjne działanie fagów wydaje się najbardziej obiecującą drogą do wprowadzenia ich do współczesnej medycyny. Dane pochodzące z naszych oraz innych badań sugerują, że ukierunkowanie terapii fagowej na klinicznie użyteczną immunomodulację może znaleźć szerokie zastosowanie. W pracy opisano badania kliniczne nad zastosowaniem fagów w chorobach przebiegających z zaburzeniem czynności układu immunologicznego takich jak nieswoiste zapalenie jelit, zakażenia wirusem Epsteina-Barr, reumatoidalne zapalenie stawów, ciężki przebieg Covid-19 czy sepsy.

Natomiast w ramach długoletniej współpracy z Wojskowym Instytutem Medycznym Państwowym Instytutem Badawczym, brałam udział w badaniach w ramach projektów dotyczących nawracających poronień. Oceniałam aktywność komórek NK oraz odsetek NK i NKT w krwi obwodowej pacjentek uRPL przed i po terapii SC. Wyniki badań *in vivo* potwierdziłam w hodowlach *in vitro* SC z PBMCs pacjentek. SC zarówno *in vivo* jak i *in vitro* obniżał aktywność komórek NK u kobiet z uRPL. Pacjentki leczone czopkami z SC urodziły zdrowe potomstwo. Wyniki projektów zostały opisane w mojej pracy doktorskiej oraz publikacji: Jerzak M, **Kniotek M**, Mrozek J, Górski A, Baranowski W. *Sildenafil citrate*

decreased natural killer cell activity and enhanced chance of successful pregnancy in women with a history of recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2008 Nov;90(5):1848-53. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.043. Epub 2008 Apr 28. PMID: 18440513

W projekcie "Zastosowanie blokerów czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF alfa) w profilaktyce poronień nawykowych ", określałam stężenia TNF- alfa oraz poziom i aktywność komórek NK u pacjentek uRPL po terapii i przed terapią lekiem Enbrel. W pracy z projektu Jerzak M, Niemiec T, Nowakowska A, **Klochowicz M**, Górski A, Baranowski W., *First successful pregnancy after addition of enoxaparin to sildenafil and etanercept immunotherapy in woman with fifteen failed IVF cycles - case report. Am J Reprod Immunol*. 2010 Aug 1;64(2):93-6. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00826.x; przedstawiono opis przypadku 35-letniej pacjentki z wielokrotnymi niepowodzeniami implantacji – łącznie 15 nieudanych cykli zapłodnienia pozaustrojowego (IVF), mimo prawidłowej odpowiedzi jajnikowej i dobrej jakości zarodków. Wcześniejsze próby leczenia z użyciem sildenafilu (w celu poprawy przepływu macicznego) oraz etanerceptu (modulacja odpowiedzi zapalnej poprzez blokowanie działania TNF- α) nie przyniosły skutku klinicznego. Włączenie do terapii enoksaparyny (heparyny drobnocząsteczkowej, LMWH) skutkowało uzyskaniem pierwszej skutecznej implantacji i donoszoną ciążą zakończoną porodem zdrowego noworodka.

Kolejne prace to: Jerzak M, **Ohams M**, Górski A, Baranowski W. *Etanercept immunotherapy in women with a history of recurrent reproductive failure. Ginekol Pol*. 2012 Apr;83(4):260-4. PMID: 22712257; gdzie oceniono skuteczność Etanerceptu, inhibitora, zmodyfikowanego receptora TNF- α , jako terapii immunomodulującej u kobiet z nawracającymi niepowodzeniami rozrodu (zarówno poronieniami, jak i niepowodzeniami implantacji w procedurach IVF). Do badania włączono pacjentki z podwyższonymi poziomami cytokin prozapalnych. Zastosowanie etanerceptu w określonych fazach cyklu (w tym w okresie okołooowulacyjnym i implantacyjnym) skutkowało poprawą wskaźnika implantacji i zwiększeniem liczby ciąż klinicznych w badanej grupie. W pracy oceniałam zależność aktywności komórek NK pacjentek od terapii biologicznej. Badania aktywności i poziomu komórek NK wykonałam przed i po terapii. Publikacja podkreśla rolę nadreaktywności zapalnej komórek NK, w szczególności przy towarzyszącej nadekspresji TNF- α , w zaburzeniach implantacji i utrzymania ciąży. Wskazuje również na potencjalną skuteczność immunoterapii celowanej w wybrane cytokiny prozapalne. Jest to jedna z pierwszych polskich prac dokumentujących zastosowanie blokady TNF- α w leczeniu niepowodzeń rozrodu.

1118 **5.3. Wykonawca i kierownik projektów:**

1119 Kierownik projektów naukowych:

1120 a) po uzyskaniu stopnia doktora:

1121 **2.2024 - 12.2027 - projekt PerMeD, akronim PerFet**, projekt realizowany we
1122 współpracy z ośrodkami z Litwy, Włoch i Irlandii, pt. *“Personalizacja leczenia niepłodności*
1123 *kobiecej i nawracających poronień o nieznanej etiologii” (Personalisation of Treatment for*
1124 *Female Infertility and Recurrent Pregnancy Loss of Unknown Etiology)* - opisany powyżej
1125 na str. 28 w rozdziale 5.1. Współpraca międzynarodowa.

1126 Rola w projekcie: Kierownik polskiej grupy badawczej,

1127 Źródło finansowania: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR)

1128 Beneficjent: WUM

1129 Budżet projektu: 1.510.767,02 PLN

1130 **2015 – 2020 - projekt NCN,**

1131 Tytuł projektu: *„Działanie immunomodulacyjne cytrynianu sildenafilu (SC), u pacjentek z*
1132 *poronieniami nawykowymi” (Immunomodulatory effects of sildenafil citrate in women with*
1133 *recurrent pregnancy loss)*

1134 Numer projektu: 2014/15/D/NZ7/01838; konkurs Sonata 8, panel NZ7

1135 Wyniki badań z projektu opublikowałam w następujących pracach, które zostały opisane w
1136 większości w cyklu prac w załączniku Autoreferat, podpunkt 4.3.3.:

1137 **Kniotek M, Boguska A.**, *Sildenafil Can Affect Innate and Adaptive Immune System in Both*
1138 *Experimental Animals and Patients, Journal of Immunology Research, 2017*

1139 **Kniotek M, Roszczyk A, Zych M, Szafarowska M, Jerzak M**, *Differences in the Expression of*
1140 *KIR, ILT Inhibitory Receptors, and VEGF Production in the Induced Decidual NK Cell*
1141 *Cultures of Fertile and RPL Women, Biomed Res Int. 2021 May 4; 2021:6673427.*

1142 **Kniotek M, Roszczyk A, Zych M, Wrzosek M, Szafarowska M, Zagożdżon R, Jerzak M**,
1143 *Sildenafil Citrate Downregulates PDE5A mRNA Expression in Women with Recurrent*
1144 *Pregnancy Loss without Altering Angiogenic Factors-A Preliminary Study, J Clin Med. 2021*
1145 *Oct 29;10(21)*

1146 **Kniotek M, Zych M, Roszczyk A, Szafarowska M, Jerzak MM**, *Decreased Production of TNF-*
1147 *α and IL-6 Inflammatory Cytokines in Non-Pregnant Idiopathic RPL Women*

1148 *Immunomodulatory Effect of Sildenafil Citrate on the Cellular Response of Idiopathic RPL*
1149 *Women, J Clin Med. 2021 Jul 15;10(14):3115*

Zych, M., Roszczyk, A., **Kniotek, M.**, Kaleta, B., & Zagozdzon, R. (2019). Sildenafil Citrate Influences Production of TNF- α in Healthy Men Lymphocytes. *Journal of immunology research*, 2019, 8478750. <https://doi.org/10.1155/2019/8478750>

W ostatniej publikacji, której byłem autorem korespondencyjnym, opisujemy wpływ cytrynianu sildenafilu na układ immunologiczny mężczyzn, zdrowych dawców krwi, a dokładnie na produkcję cytokin prozapalnych oraz przeciwzapalnych. Celem pracy było sprawdzenie, czy sildenafil (inhibitor PDE-5) wpływa na produkcję cytokin typu Th1 (TNF- α , IFN- γ) i Th2 (TGF- β , IL-10) w hodowlach limfocytów pochodzących od zdrowych mężczyzn. Badanie przeprowadzono na wyizolowanych PBMCs od 27 zdrowych dawców krwi. Komórki inkubowano z sildenafilem w stężeniu 400 ng/ml, a następnie poddawano stymulacji różnymi bodźcami aktywującymi limfocyty T: bezpośrednią aktywacją szlaku PKC (PMA/jonomycyna) lub mitogenem roślinnym fitohemaglutynina (PHA). Wydzielanie cytokin zahamowano dodając Golgi-Stop. Analizowano odsetek limfocytów produkujących cytokiny prozapalne (TNF- α , IFN- γ) oraz przeciwzapalne (TGF- β , IL-10) metodą cytometrii przepływowej. Uzyskane wyniki wykazały, że w warunkach stymulacji PMA/jonomycyną sildenafil istotnie zmniejszał odsetek komórek T wytwarzających TNF- α , przy jednoczesnej tendencji (nieistotnej statystycznie) do obniżenia produkcji IFN- γ . Efekt ten nie był obserwowany w przypadku stymulacji PHA, co sugeruje, że działanie sildenafilu może być zależne od rodzaju aktywowanego szlaku sygnalizacyjnego. Nie stwierdzono istotnych zmian w produkcji cytokin przeciwzapalnych. Zależność efektu od sposobu stymulacji limfocytów podkreśla złożoność działania leku na komórki układu odpornościowego oraz wpływ hormonów płciowych na działanie sildenafilu.

b) Kierownik projektów przed uzyskaniem stopnia doktora:

Projekt młodego badacza, WUM, 2008-2010;

Tytuł projektu: *“Wpływ bakteriofagów T4, T2, HAP-1 oraz PsF-8 na populację komórek cytotoksycznych i na regulatorowe komórki NKT oraz na aktywność komórek NK (The influence of bacteriophages T4, T2, HAP-1 and PsF-8 on population of cytotoxic cells and regulatory NKT cells and activity of NK cells)”*

Moje badania obejmowały wpływ bakteriofagów na populację komórek NK - zarówno ich ilość i żywotność, jak i aktywność ocenianą w hodowlach z bakteriofagami metodą cytometrii przepływowej. Otrzymane wyniki sugerowały właściwości immunomodulacyjne bakteriofagów *E. coli* T4 oraz T2. U osób z wysoką aktywnością komórek NK, mierzoną stopniem zabijania komórek linii nowotworowej K562, fagi znamienne ją obniżały, a w

przypadku osób z niską aktywnością podwyższały. Wyniki projektu zaprezentowałam na sesjach plakatowych na konferencjach:

M. Kłochowicz, G. Korczak-Kowalska, D. Kłosowska, P. Wierzbicki, B. Weber-Dąbrowska, A. Górski, The influence of T4, T2, HAP-1 and PsF-8 bacteriophages on human Natural Killer cells, II Polsko-Ukraińska Konferencja, Mikrobiologia w XXI wieku, ku pamięci Profesora Rudolfa Stefan Weigla (1883-1957), 24-26.09.2007, Warszawa

M. Kłochowicz, G. Korczak-Kowalska, D. Kłosowska, P. Wierzbicki, B. Weber-Dąbrowska, A. Górski, The effects of T4, T2 and HAP-1 bacteriophages on human NK cell activity in vitro, XII Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Klinicznej i Doświadczalnej, 8-10.06.2008, Kraków
Projekt Młodego badacza, WUM, 2011-2012;

Tytuł projektu: Interakcja limfocytów T z bakteriofagami T4 (Interaction of T cells with bacteriophages T4)

W projekcie określałam interakcje białek kapsydu bakteriofagów z cząsteczkami adhezyjnymi limfocytów T. Oznaczenie interakcji fagów z integrinami przeprowadziłam poprzez opłaszczanie białkami macierzy plastikowych płytek typu Maxisorb. Wyniki wskazywały na potencjalne interakcje białka kapsydu gp24 faga T4 z ludzkimi limfocytami T (poprzez integrinę Beta-1, Beta-3 oraz VLA-4). Wyniki projektu młodego badacza opublikowano wraz z innymi wynikami z projektu "Optymalizacja charakterystyki i przygotowania preparatów fagowych do celów terapeutycznych" w artykule:

Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, Korczak-Kowalska G, Olszowska-Zaremba N, Łusiak-Szelachowska M, Kłak M, Jończyk E, Kaniuga E, Gołaś A, Purchla S, Weber-Dąbrowska B, Letkiewicz S, Fortuna W, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłosowska D. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy, Adv Virus Res. 2012;83:41-71

5.4.1. Wykonawca w projektach:

a) przed uzyskaniem stopnia doktora:

Data: 1.09.2007-30.06.2012

Tytuł projektu: Optymalizacja charakterystyki i przygotowania preparatów fagowych do celów terapeutycznych

Źródło finansowania: POIG

Beneficjent: ITTD PAN Wrocław

Kierownik projektu: prof. dr hab. n.med. Andrzej Górski

1218 Wyniki opisano w publikacji: Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska
1219 K, Wierzbicki P, **Ohams M**, Korczak-Kowalska G, Olszowska-Zaremba N, Łusiak-
1220 Szelachowska M, Kłak M, Jończyk E, Kaniuga E, Golaś A, Purchla S, Weber-Dąbrowska B,
1221 Letkiewicz S, Fortuna W, Szufnarowski K, Pawelczyk Z, Rogóż P, Kłosowska D. *Phage as a*
1222 *modulator of immune responses: practical implications for phage therapy*, *Adv Virus Res.*
1223 *2012; 83:41-71* (praca opisana powyżej oraz w cyklu prac powstałych w ramach współpracy z
1224 innymi uczelniami rozdz. 5.2. str. 33)

1225

1226 Data: 08.09.2007 - 02.09.2008

1227 **Tytuł projektu:** *Wpływ sildenafilu na aktywność komórek NK u kobiet z poronieniami*
1228 *nawykowymi.*

1229 Źródło finansowania: 33 konkurs Ministra Szkolnictwa Wyższego, MNiSW

1230 Beneficjent: Wojskowy Instytut Medyczny - Państwowy Instytut Badawczy

1231 Kierownik: prof. dr hab. n.med. Małgorzata Maria Jerzak,

1232

1233 Data: 02.06.2008 - 01.06.2011,

1234 **Tytuł projektu:** *Zastosowanie blokerów czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF alfa) w*
1235 *profilaktyce poronień nawykowych*

1236 Źródło finansowania: 34 konkurs Ministra Szkolnictwa Wyższego, MNiSW

1237 Beneficjent: Wojskowy Instytut Medyczny - Państwowy Instytut Badawczy

1238 Kierownik: prof. dr hab. n.med. Małgorzata Maria Jerzak

1239 (wyniki prac opisane powyżej w rozdziale o współpracy międzyuczelnianej, str. 33-34)

1240 b) po uzyskaniu stopnia doktora:

1241 Data: 2018 - 2024

1242 **Tytuł projektu:** "Immunomodulacyjny wpływ bakteriofagów na funkcje komórek układu
1243 immunologicznego"

1244 nr projektu: 2018/31/B/NZ6/03999, OPUS 16, panel: NZ6

1245 Kierownik: dr Ryszard Międzybrodzki, IliTD PAN, Wrocław

1246 W projekcie badałam wpływ oczyszczonych bakteriofagów *Escherichia coli* T4 oraz
1247 *Staphylococcus aureus* A5 w różnych mianach, na produkcję cytokin przez różne subpopulacje
1248 komórek układu odpornościowego zdrowych dawców krwi. Izolowałam z kożuszków
1249 leukocytnych różne grupy komórek, w tym limfocyty (CD3⁺), pomocnicze Th (CD4⁺),
1250 cytotoksyczne Tc (CD8⁺), limfocyty B (CD19⁺), komórki NK (CD56⁺CD3⁻), monocyty

1251 (CD14⁺CD16⁺CD33⁺), a następnie badałam efekt fagów na produkcję cytokin w hodowlach
1252 w/w populacji komórek z wykorzystaniem platformy Luminex.

1253 Publikacje z projektu: *Andrzej Górski, Ryszard Międzybrodzki, Ewa Jończyk-Matysiak,*
1254 **Monika Kniotek, Sławomir Letkiewicz, Therapeutic Phages as Modulators of the Immune**
1255 *Response: Practical Implications, Clinical Infectious Diseases, Volume 77, Issue*
1256 *Supplement_5, 1 November 2023, Pages S433–S439, <https://doi.org/10.1093/cid/ciad483>*
1257 (praca omówiona powyżej w cyklu prac powstałych we współpracy z IITD PAN, Wrocław)

1258 Udział w sesji plakatowej na konferencji: Hubert Kasprzak, **Monika Kniotek**, Andrzej
1259 Górski, Ryszard Międzybrodzki, “Studies on the immunomodulatory effects of
1260 bacteriophages on functions of immune cells – a preliminary report”, 5th BIO-Congress -13-
1261 16.09.2023, Szczecin.

1262

1263 Data: 06.2018-12.2020

1264 **Tytuł projektu:** “Wpływ czynnika HIF- α na właściwości immunomodulujące ludzkich
1265 komórki mezenchymalnych”

1266 nr projektu: 2017/25/B/NZ6/01380, NCN, Opus13, panel NZ6

1267 Kierownik: prof. dr hab. n.med. Leszek Pączek,

1268 Beneficjent: WUM

1269 Publikacja z wyników projektu: *Dymowska M, Aksamit A, Zielniok K, **Kniotek M**, Kaleta B,*
1270 *Roszczyk A, Zych M, Dąbrowski F, Pączek L, Burdzińska A. Interaction between Macrophages*
1271 *and Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Wharton's Jelly-A*
1272 *Comparative Study. Pharmaceutics. 2021 Nov 1;13(11):1822. doi:*
1273 *10.3390/pharmaceutics13111822. PMID: 34834238; PMCID: PMC8624657*

1274 Celem pracy była porównawcza analiza interakcji pomiędzy ludzkimi
1275 mezenchymalnymi komórkami zrębu (MSC) pochodzącymi ze szpiku kostnego (BM-MSC)
1276 oraz z galarety Whartona pępowiny (WJ-MSC) a makrofagami ludzkimi różnicowanymi z
1277 monocytów krwi obwodowej in vitro. Badania skupiły się na ocenie wpływu MSC na fenotyp,
1278 profil cytokinowy i funkcję makrofagów. W projekcie wykonywałam analizy ekspresji
1279 markerów powierzchniowych, w tym CD80, CD86, CD163, CD206, które potwierdziły
1280 przesunięcie fenotypowe w stronę makrofagów M2. Wnioski z pracy wskazują, że pochodzenie
1281 MSC ma istotne znaczenie dla ich właściwości immunomodulacyjnych i zdolności do
1282 reprogramowania makrofagów. Wyniki te mogą mieć praktyczne zastosowanie w terapii
1283 komórkowej chorób zapalnych, autoimmunologicznych oraz w medycynie regeneracyjnej.

1284

1285 Data: 20.08.2014-20.09.2018

1286 **Tytuł projektu:** Przeciwwirusowe właściwości bakteriofagów” (Antiviral activity of
1287 bacteriophages),

1288 nr projektu: 2013/11/B/NZ1/02107, NCN, Opus 6, panel: NZ1

1289 Kierownik: prof. dr hab. n.med. Andrzej Górski, WUM

1290 Publikacje wyników projektu: *Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K,*
1291 *Wierzbicki P, Ohams M, Korczak-Kowalska G, Olszowska-Zaremba N, Łusiak-Szelachowska*
1292 *M, Kłak M, Jończyk E, Kaniuga E, Gołaś A, Purchla S, Weber-Dąbrowska B, Letkiewicz S,*
1293 *Fortuna W, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłosowska D. Phage as a modulator of*
1294 *immune responses: practical implications for phage therapy. Adv Virus Res. 2012; 83:41-71.*
1295 (Praca omówiona powyżej w cyklu prac powstałych w współpracy z IITD PAN, Wrocław)

1296

1297 Data: 09.2013-09.2016

1298 **Tytuł projektu:** Selenowane polisacharydy - badania nad biosyntezą i zależnością pomiędzy
1299 strukturą a aktywnością immunologiczną (Selected polysaccharides-studies and biosynthesis
1300 and the relationship between structure and immunological activity)

1301 nr projektu: 2013/09/B/NZ7/03978, NCN, OPUS 5, panel: NZ7

1302 Kierownik: prof. dr hab. n.med. Jadwiga Turło , WUM

1303 Publikacje wyników projektu: *Kaleta, B.; Roszczyk, A.; Zych, M.; Kniotek, M.; Zagożdżon, R.;*
1304 *Klimaszewska, M.; Malinowska, E.; Pac, M.; Turło, J. Selective Biological Effects of Selenium-*
1305 *Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human*
1306 *Immune Cells. Biomolecules 2021, 11, 1777.*

1307 W projekcie określającym immunomodulacyjny wpływ selenowanych polisacharydów (Se-Le-
1308 30) oceniałam aktywność komórek NK izolowanych od zdrowych dawców krwi przed i po
1309 hodowli z polisacharydem. Polisacharyd obniżał lub podwyższał aktywność tych komórek w
1310 zależności od ich stanu wyjściowego. Wyniki badań wskazywały na potencjalne zastosowanie
1311 Se-Le-30 jako bezpiecznego, naturalnego regulatora odpowiedzi immunologicznej.

1312

1313 **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz**
1314 **popularyzujących naukę lub sztukę**

1315

1316 Od początku pracy, tzn. od 2001 r., prowadzę w Zakładzie zajęcia dydaktyczne dla studentów
1317 medycyny IV i VI roku (Wydział Lekarski), studentów studiów anglojęzycznych II i IV roku

1318 (Wydział English Division), a także seminaria z Immunopatologii dla studentów IV roku
1319 Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego WUM.

1320 Byłam promotorem i opiekunem naukowym prac magisterskich powstałych w ramach projektu
1321 Sonata 8, pt.: "*Ocena stężeń cytokin wytwarzanych przez limfocyty Th1/Th2/Th17 u kobiet z*
1322 *poronieniami nawykowymi oraz ocena wpływu cytrynianu sildenafilu na wytwarzanie cytokin*
1323 *w odpowiedzi Th1/Th2/Th1.7*" oraz "*Wpływ cytrynianu sildenafilu na ekspresję KIR2DL1,*
1324 *NKG2A, LILRB-1,-2 na idNK, oraz na indukcję pbNK do idNK. Porównanie ekspresji CD9,*
1325 *CD49a, CD158a, CD159a, CD85d, CD85j na idNK między grupą kontrolną a grupą kobiet z*
1326 *poronieniami nawykowymi.*" Dalsze prace ze studentami/doktorantami obejmowały pomoc i
1327 nadzorowanie ich pracy badawczej oraz publikacji wyników z rozpraw doktorskich.

1328

1329 Od 2018 - 2022 roku dzięki doświadczeniu w walidacji metod diagnostycznych w ramach pracy
1330 magisterskiej, gdzie przeprowadziłam walidację testu "BAT - Test aktywacji bazofili" (który
1331 trafił do paneli diagnostycznych), oraz tytułowi Diagnosty Laboratoryjnego, założyłam i
1332 prowadziłam zespół diagnostyczny Pracowni Diagnostyki Immunologicznej ZIK. Prace
1333 diagnostyczne zaowocowały publikacją moją i doktorantów analityki medycznej: Roszczyk,
1334 A., Zych, M., Sołdacki, D., Zagożdżon, R., & **Kniotek, M. J.** (2024). *Reference values of*
1335 *lymphocyte subsets from healthy Polish adults*, Cent Eur J Immunol, 49(1), 26–36. Wraz z
1336 doktorantami stworzyliśmy zakresy wartości referencyjnych dla głównych populacji i
1337 subpopulacji limfocytów B oraz T, u zdrowych polskich dorosłych dawców krwi, z
1338 uwzględnieniem podziału na płeć. Wykazaliśmy istotne różnice dotyczące zarówno liczby
1339 bezwzględnej, jak i procentowego udziału limfocytów obwodowych zależne od płci.

1340 Jako diagnosta prowadziłam badania oceny funkcji układu immunologicznego dla pacjentów
1341 Klinik UCK WUM, innych szpitali, oraz prywatnych klinik leczenia niepłodności; wyniki tych
1342 badań często były wykorzystywane w pracach naukowych.

1343 W ramach współpracy z laboratorium Cytolab, Katowice, opracowałam oraz walidowałam
1344 metodę cytometryczną oceny mieszanej hodowli limfocytów - MLR, wykorzystywaną u
1345 pacjentek z niepowodzeniem rozrodu do oceny działania immunoterapii (alternatywa dla
1346 metody izotopowej).

1347 W latach 2001-2017 jako Inspektor Ochrony Radiologicznej (IOR-1) szkoliłam i
1348 nadzorowałam prace pracowników oraz studentów koła naukowego w bezpiecznej pracy ze
1349 związkami zawierającymi izotopy pierwiastków promieniotwórczych (H-3, J-125) oraz prace
1350 z wysokoaktywnym źródłem promieniowania (Cs137). Opracowałam dokumentację pracowni,
1351 zdobywałam zezwolenia na prace ze źródłami promieniowania i certyfikacje pracowni

nadawane przez Państwową Agencję Atomistyki. W pracowniach izotopowych nadzorowanych i prowadzonych przeze mnie zrealizowano liczne projekty badawcze oraz badania diagnostyczne. Prace powstałe z badań zostały nagrodzone Nagrodami Rektora (np.: Bajor, Małgorzata et al. "Targeting peroxiredoxin 1 impairs growth of breast cancer cells and potently sensitises these cells to prooxidant agents." *British Journal of Cancer* vol. 119,7 (2018): 873-884.)

Od 2015 roku, jestem recenzentem prac naukowych w międzynarodowych czasopismach, takich jak: *The Journal of Obstetrics and Gynecology*, *Biology of Reproduction*, *Reproduction*, *Cytokine*, *International Journal of Medical Sciences*, *Journal of Immunology Research*, *Central European Journal of Immunology*.

Byłam także recenzentem naukowym abstraktów przesłanych przez studentów na XIX Międzynarodowy Warszawski Kongres Medyczny, 12–14.04.2024, WUM, Warszawa.

Aktualnie jako gościnny redaktor *International Journal of Molecular Sciences* (MDPI) nadzoruję proces publikacji treści na forum międzynarodowym w zakresie immunologii rozrodu.

Jako uczestnik 33 konferencji i zjazdów naukowych, krajowych i zagranicznych propagowałam moje osiągnięcia naukowe i wyniki badań, jak i prowadziłam wykłady naukowe na zaproszenie podczas zagranicznych konferencji (szczegółowa lista konferencji poniżej, rozdz. 6.2.).

Stale podnoszę swoje kwalifikacje naukowe i dydaktyczne oraz jako diagnosta laboratoryjny regularnie uczestnicząc w konferencjach naukowych, szkoleniach oraz kursach doszkalających dla diagnostów.

6.1. Nagrody i dyplomy

a) po uzyskaniu stopnia doktora nauk

24.11.2025 - Nagroda Rektora WUM zespołowa III-go stopnia, za publikację wyników, które posłużyły do zdobycia finansowania nowego projektu w ramach The European Partnership for Personalised Medicine,

09.2024 – Nagroda Rektora WUM zespołowa II-go stopnia za osiągnięcia naukowe, za pracę poglądową nt. fagów jako modulatorów odpowiedzi immunologicznej,

09.2024 – Nagroda Rektora WUM zespołowa III-go stopnia, za badania rozpuszczalnych form immunologicznych punktów kontrolnych i ich ligandów w przebiegu ciąży,

14.04.2023- Nagroda Rektora WUM za zrealizowanie projektu NCN, Sonata 8, z oceną NCN bardzo dobrą.

09.2018 – Nagroda Rektora WUM zespołowa II-go stopnia za publikację Bajor, M., Zych, A. O., Graczyk-Jarzynka, A., Muchowicz, A., Firczuk, M., Trzeciak, L., Gaj, P., Domagala, A., Siernicka, M., Zagodzón, A., Siedlecki, P., **Kniotek, M.**, O'Leary, P. C., Golab, J., & Zagodzón, R. (2018). Targeting peroxiredoxin 1 impairs growth of breast cancer cells and potentially sensitises these cells to prooxidant agents. British journal of cancer, 119(7), 873–884.

22.04.2017 - Wyróżnienie za publikację *“Successful pregnancy after Intralipid addition to sildenafil and enoxaparin as a treatment of recurrent implantation failure”*, Jerzak M, Szafarowska M, **Kniotek M**, Gorski A. - Annual Conference in reproductive medicine Recurrent implantation failure: A journey into deep understanding, Mediolan, Włochy

b) przed uzyskaniem stopnia doktora nauk

23-27.10.2010 doniesienie ustne nagrodzone przez Reproductive Immunology SIG Prize Paper Award Jerzak Małgorzata, **Klochowicz M.**, Górski A., Baranowski W. *Etanercept immunotherapy in women with history of recurrent miscarriage*. Fertil. Steril. 2010: Vol. 94, nr 4 Suppl., s. S46 Taking Reproductive Medicine to New Heights! ASRM 2010, Denver, Colorado, USA.

8.11.2004 - Nagroda Rektora indywidualna za prace naukowe dotyczące oryginalnych nowych badań nad oddziaływaniem bakteriofagów z układem odpornościowym

6.2. Propagowanie treści naukowych na konferencjach i zjazdach naukowych.

I. Wykłady na zaproszenie na konferencjach:

1. **M. Kniotek**: “HLA-histocompatibility - Recipient-donor Selection”, Autoimmune, allergy, immunodeficiency and immunological havoc: modern diagnostic and treatment, 28.11.-01.12. 2018, Danylo Halytskyi Lviv National University Lwów, Ukraina.

2. **M. Kniotek**: “Wybrane Metody Immunodiagnostyczne u Kobiet Z Nawracającymi Poronieniami”, X international Christmas readings in Clinical immunology and Allergology in Lviv «COVID-19, long-COVID-19, post-COVID-19: their multiplicity and immune disorders», Ukrainian Society of Immunologists, Allergists, Immunorehabilitologists, Danylo Halytskyi Lviv National University and Shevchenko Scientific Society Medical Commission. 9-10.12.2021, Lwów, Ukraina

- 1419 3. **M. Kniotek**: “The Role of Immune Checkpoints Controlling Trophoblast Invasion and
1420 Development of a Physiological Pregnancy: ICPs as Potential Biomarkers and
1421 Therapeutic Agents in Recurrent Pregnancy Loss”- International Conference on
1422 Immunology and Vaccination, 25-26.11.2024, Zurich, Switzerland
1423

1424 **II. Wystąpienia ustne – prezentacja wyników badań:**

- 1425 1. A. Roszczyk, M. Zych, **M. Kniotek**, B. Kaleta, R. Zagożdżon, Sildenafil Citrate May
1426 Decrease Production Of Tnf α In Healthy Men T Lymphocytes, IV Zjazd Naukowy
1427 Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej "Biologia-Medycyna-Terapia 22-25-05-
1428 2019, Szczawnica.
- 1429 2. M. Zych, **M. Kniotek**, A. Roszczyk, R. Zagożdżon, Expression Of Immune Checkpoints
1430 On Lymphocytes From Women With Pregnancy Loss, As A Point Of Potential Therapy,
1431 IV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej "Biologia-Medycyna-
1432 Terapia 22.05 - 25.05.2019, Szczawnica.
- 1433 3. **M. Kniotek**, Surface Immune Checkpoints As A Potential Biomarker In Pregnancy And
1434 Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss, XVIII Kongres PTiDiK Polskiego Towarzystwa
1435 Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, 16 – 18.05.2024, Białystok, Polska
- 1436 4. M. Zych, **M. Kniotek**, F. Dąbrowski, A. Roszczyk, R. Zagożdżon, The Influence Of
1437 Sex Hormones On The Immune Checkpoints' Expression In Recurrent Pregnancy Loss
1438 And Pregnant Women, Iffs World Congress 2025 (IFFS2025) - 26-29.04.2025, Tokyo,
1439 JAPAN
1440

1441 **III. Prezentacje na sesjach plakatowych:**

- 1442 5. **M. Kniotek**, AMA Ahmed, K. Dąbrowska, K. Świtała-Jeleń, A. Opolski, A. Górski,
1443 Bacteriophages interactions with T cells and platelets, Cytokine Network, Regulatory
1444 Cells, Signalling, and Apoptosis, Immunology 2004, p.189- 194, 12th International
1445 Congress of Immunology and 4t Annual Conference of FOCIS, Montreal, Canada, July
1446 18-23, 2004
- 1447 6. **M. Kniotek**, B. Weber-Dabrowska, K. Dąbrowska, K. Świtała-Jeleń, J. Boratyński, M.
1448 Wiszniowski, W. Glinkowski, I. Babiak, A. Górecki, M. Nowaczyk, A. Górski, Phages
1449 as immunomodulators of antibody production Genomic Issues, Immune System,
1450 Activation and Allergy, Immunology 2004, p.33-37, 12th International Congress of
1451 Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal, Canada, July 18-23,2004

- 1452 7. M. Jerzak, **M. Kniotek**, A. Górski, W. Baranowski, Jerzak M., Immunotherapy
 1453 regulates immune activity in women with the history of recurrent spontaneous abortion,
 1454 Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology, Immunology 2004 p. 295-299, 14th
 1455 International Conference of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology, Edinburgh
 1456 Scotland May 16-19, 2004
- 1457 8. P. Wierzbicki, M. Nowaczyk, J. Wyzgał, D. Kłosowska, **M. Kniotek**, I. Podobińska, A.
 1458 Chmura, L. Pączek, M. Lao, A. Górski, Intracellular cytokine synthesis by T cells of
 1459 renal allograft recipients with a viral infection, Cytokines, Immunology 2004, p. 279-
 1460 284, 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS,
 1461 Montreal, Canada, July 18-23, 2004
- 1462 9. E. Krawczyk, M. Przybylski, A. Majewska, **M. Kniotek**, M. Nowaczyk, M. Łuczak,
 1463 Przeciwwirusowe i immunotropowe oddziaływanie pochodnych naturalnych
 1464 seskwiterpenów oraz taksolu, Postępy Mikrobiologii, supl 1(43) p. 113, 2004, XXV-
 1465 Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, 23-25.09.2004
- 1466 10. Górski A, Weber-Dąbrowska B., Światała-Jeleń K., Opolski A., Nowaczyk M., **Kniotek**
 1467 **M.**, Gorczyca W., Przerwa A., Nowe perspektywy terapii fagowej, XXV-Jubileuszowy
 1468 Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, 23-25.09.2004
- 1469 11. E. Krawczyk, **M. Kniotek**, A. Majewska, M. Nowaczyk, M. Łuczak, Antiviral and
 1470 immunotropic effects of two derivatives of isolactarorufin, a sesquiterpene isolated from
 1471 Lactarius mushroom - Second European Congress of Virology, EuroVirology, Madryt,
 1472 Hiszpania, 5-9.09.2004
- 1473 12. A. Górski, B. Weber-Dąbrowska, K. Dąbrowska, A. Opolski, R. Międzybrodzki, K.
 1474 Światała--Jeleń, J. Boratyński, M. Nowaczyk, **M. Kniotek**, P. Wierzbicki, The New
 1475 Phage Biology: Clinical phage therapy: present and future, Key Biscayne, USA
 1476 American Society for Microbiology Conference, 01-08.08.2004
- 1477 13. M. Jerzak, **M. Kniotek**, N. Stachowicz, A. Górski, W. Baranowski, Impaired uterine
 1478 blood flow can predict increased natural killer cell activity in women with a history of
 1479 recurrent pregnancy loss” – Am J Reprod Immunol, 2004, 51, pp.:477-478- European
 1480 Congress of Reproductive Immunology. Pilsen, Czech Republic, 30.06-3.07.2004
- 1481 14. M. Jerzak, **M. Kniotek**, N. Stachowicz, A. Górski, W. Baranowski, Sildenafil does not
 1482 influence natural killer cell activity in women with a history of recurrent spontaneous
 1483 abortion, Am. J. Reprod. Immunol., 2005, Vol. 53, nr 6, s. 290-291, American Society
 1484 for Reproductive Immunology 25th Anniversary Meeting, Providence, Rhode Island
 1485 June 16-18, 2005

15. M. Jerzak, **M. Kniotek**, A. Górski, W. Baranowski., Tytuł: Zastosowanie blokerów czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF-alfa) w profilaktyce poronień nawykowych - doniesienie wstępne, Ginekologia Polska 2006, 77, Supl. 1, s. 24, Konferencja: Polskie Towarzystwo Ginekologiczne, Poznań, -09.02.2006.
16. M Jerzak, **M. Kniotek**, J. Mrozek, N. Stachowicz, A. Górski, W Baranowski, Sildenafil does not influence natural killer cell activity in women with a history of recurrent spontaneous abortion, Second Embic Summer School, "Molecular Mechanisms of Implantation", s.34, EMBICS, University of Pecs, Hungary/July 1st - July 4th, 2006
17. M Jerzak, **M. Kniotek**, J. Mrozek, S. Stachowicz, A. Górski, W Baranowski, Sildenafil decreased NK cell activity and promoted successful pregnancy in women with a history of RSA. The 9th World Congress on Controversies in Obstetrics Gynecology & Infertility, Program & Abstracts, s.53; Barcelona, Spain, March 22-25, 2007
18. **M. Kłochowicz**, G. Korczak-Kowalska, D. Kłosowska, P. Wierzbicki, B. Weber-Dąbrowska, A. Gorski, The influence of T4, T2, HAP-1 and PsF-8 bacteriophages on human Natural Killer cells – Druga Polsko-Ukraińska Konferencja, Mikrobiologia w XXI wieku, ku pamięci Profesora Rudolfa Stefan Weigla (1883-1957), 24-26 września, 2007, Warszawa
19. M. Jerzak, T. Niemiec, **M. Kłochowicz**, A. Górski, W. Baranowski, Successful pregnancy after etanercept immunotherapy in women with a history of recurrent miscarriage, American Journal of Reproductive Immunology, 2008.06.11, Vol. 59, nr 6, s. 476; Chicago, USA
20. **M. Kłochowicz**, G. Korczak-Kowalska, D. Kłosowska, P. Wierzbicki, B. Weber-Dąbrowska, Andrzej Górski, The effects of T4, T2 and HAP-1 bacteriophages on human NK cell activity in vitro, XII Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Klinicznej i Doświadczalnej, Kraków, 8-10.06.2008,
21. P. Piątkiewicz, A. Czech, **M. Kniotek**, M. Nowaczyk, Badania nieswoistej odpowiedzi immunologicznej na modelu komórek NK krwi obwodowej osób zdrowych oraz osób ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 2, IV Karpacka Konferencja Diabetologiczna, Kraków, 215-18.05.2008
22. M. Jerzak, **M. Kłochowicz**, A. Górski, W. Baranowski, "Etanercept immunotherapy in women with a history of recurrent miscarriage" 5 zjazd Fertility and Sterility, ASRM, 6.09.2010, USA
23. A. Górski, R. Międzybrodzki, J. Borysowski, P. Wierzbicki, **M. Kniotek**, Korczak-Kowalska G, Łusiak-Szelachowska M, Gołaś A, Weber-Dąbrowska B, Letkiewicz S,

- Fortuna W, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłosowska D. Immunomodulating effects of phage: new avenues for phage therapy? Phages 2011: Bacteriophage Applications, 19-21 września 2011 r, Oxford, Wielka Brytania
24. Postępy w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych: terapia fagowa – podstawy i możliwości zastosowania – IITD PAN Wrocław, 03.12.2016, Warszawa
25. **M. Kniotek**, M. Zych, A. Roszczyk, M. Jerzak, The influence of sildenafil citrate on production of cytokines in women with recurrent pregnancy loss, XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, 8-10.06.2017, Warszawa
26. **M. Kniotek**, A. Roszczyk, P. Wierzbicki, D. Kłosowska, M. Jerzak, The influence of sildenafil citrate on KIR expression on induced decidual NK cells, XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, 8-10.06.2017, Warszawa
27. Hubert Kasprzak, **Monika Kniotek**, Andrzej Górski, Ryszard Międzybrodzki, “Studies on the immunomodulatory effects of bacteriophages on functions of immune cells – a preliminary report”, 5th BIO-Congress -13-16.09.2023, Szczecin
28. M. Zych, **M. Kniotek**, F. Dąbrowski, A. Roszczyk, R. Zagożdżon, The influence of sex hormones on the immune checkpoints' expression in recurrent pregnancy loss and pregnant women, 7th European Congress of Immunology – Conquering Challenges in Immunology, ECI 2024, 01 - 04.09.2024, Dublin, Irlandia
29. M. Zych, A. Roszczyk, F. Dąbrowski, R. Zagożdżon, L. Pączek **M. Kniotek**, “Sex Hormone-Mediated Modulation of Immune Checkpoints in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Loss” European Society of Clinical Cell Analysis - ESCCA, 17-20.09.2025, Montpellier, France
- Konferencje naukowo-szkoleniowe:**
1. Transplant Histocompatibility Workshop – The University of Texas, Medical School at Houston and Department of General and Transplantation Surgery, Warsaw Medical School, 09.05.2005, Warszawa
 2. Seminarium szkoleniowe “Auditor Wewnętrzny Systemu Jakości” Przedsiębiorstwo Doradczo - Wdrożeniowe MS QUALITY, 6-7.06.2005, ZIK WUM, Warszawa
 3. Immunologia i Immunoterapia –warsztaty cytometryczne - AM Lublin, 27.09.2006, Kazimierz Dolny
 4. II Sympozjum naukowo - szkoleniowe “Żywy Dawca Nerki” - zorganizowane przez Katedrę i Klinikę Chirurgii ogólnej i Transplantacyjnej, Instytut Transplantologii im. T. Orłowskiego, WUM, 28-29.09.2012, Warszawa

5. Principles of Flow Cytometry - Expert Cytometry, Laboratorium Cytometrii Przepływowej Katedry i Zakładu Podstaw Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz Pracowni Immunologii Klinicznej i Eksperymentalnej Katedry Immunologii Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu. Kurs pod patronatem Polskiego Towarzystwa Cytometrii (PTC), 11-12.10.2018, Wrocław
6. III Flow Cytometry Conference "Practical Cytometry" - Expert Cytometry- ExCyte, Beckman Coulter, Immbionic sp z o.o. oraz Katedra Immunologii CM UMK, Bydgoszcz, 2019, Polska
7. "Cytometria Przepływowa - Małe jest piękne", Immbionic sp z o.o. oraz Katedra Immunologii CM UMK, 23-24.11.2023, Bydgoszcz, Polska
8. IX Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Stare i nowe patogeny – aktualne problemy”, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, 16 - 17.02.2024, Lublin, Polska
9. IV Konferencja online "Immunologia Rozrodu", ProCreatio, 1-2.03.2024
10. Kurs KIDL: "Kursy podnoszące kwalifikacje kadry medycznej udzielającej świadczeń zdrowotnych w tym w związku z chorobą zakaźną w szczególności COVID-19" w ramach programu operacyjnego –01.01.2022 - 31.12-.023, Warszawa, Polska
11. Neuroimmunologia w praktyce – gdzie jesteśmy i dokąd zmierzamy - konferencja online", Polskie Towarzystwo Neurologiczne - 19 – 27.10.2023, Polska
12. Advancing Science and Translational Research with Bioluminescent Technologies - Discover Glo 2025, Promega – 22.05.2025, Warszawa, Polska
13. FarU Immunology Meeting, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, Spotkanie w ramach Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej - 7.06.2025, Gdańsk, Polska
14. Virtual Prague School on Flow Cytometry Advanced Applications in Hematology and Immunology, ESCCA - 20-23.10.2025, Praga, Czechy

podpis wnioskodawcy