

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Michała Czarnogórskiego pod tytułem:
"Ageing of long-term allogeneic hematopoietic cells recipients
compared to their donors"**

Starzenie się jest uniwersalnym zjawiskiem biologicznym. To wysoce heterogeny proces, który wpływa na wszystkie tkanki i układy, prowadząc do stopniowej utraty ich funkcji. W kontekście starzenia komórkowego charakteryzuje się on rozregulowaniem „pracy” mitochondriów w następstwie zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), uszkodzeń DNA i skracania telomerów. Obecnie istnieje rosnąca tendencja do postrzegania starzenia się nie tylko jako szkodliwego procesu, ale także jako ciągłej adaptacji do zmieniającego się środowiska wewnętrznego organizmu ("teoria adaptacji"), w przeciwieństwie do tradycyjnej koncepcji tych zmian, postrzeganych głównie jako szkodliwe. Od lat sześćdziesiątych XX wieku wiemy, że komórki dzielą się, aż osiągną tak zwany limit Hayflicka, który jest pewną, skończoną liczbą podziałów komórkowych, zanim wejdą w stan starzenia. Wynika to ze skracania telomerów, występującego przy każdym podziale komórkowym. Po osiągnięciu krytycznej długości telomerów, dalsze podziały są niemożliwe bez uszkodzenia sekwencji kodującej DNA komórki, wchodzi ona w fazę starzenia lub ulega apoptozie. Najbardziej wyraźne skracanie telomerów przez całe życie zachodzi w limfocytach. Starzenie się układu odpornościowego składa się z dwóch, wzajemnie powiązanych zjawisk, a mianowicie - immunosenescencji i inflammagingu (w mojej recenzji zapalenia), *inflammaging*, słowo powstałe z połączenia wyrazów *inflammation* (stan zapalny) oraz *aging* (starzenie się). Immunosenescencja to wyraźny spadek wielu parametrów immunologicznych, głównie dotyczących odporności adaptacyjnej. Zmiany immunofenotypowe związane ze starzeniem się obejmują między innymi wzrost odsetka anergicznym limfocytów CD8+, zwiększony odsetek limfocytów Treg i Th2 oraz utratę CD28. Limfocyty T CD28(-) charakteryzują się zmniejszoną żywotnością replikacyjną, zmniejszoną zdolnością proliferacyjną i zmniejszoną odpowiedzią na stymulację antygenem, wykazując jednocześnie zwiększoną aktywność cytotoksyczną. Zapalenie jest przewlekłym, jałowym, niezakaźnym stanem o niskim stopniu nasilenia, występującym u osób starszych. Jest ono spowodowane nagromadzeniem czynników prozapalnych i zmianą fenotypu komórek (w tym limfocytów T) na prozapalny, co następuje wraz ze starzeniem się. Obserwujemy umiarkowany wzrost stężenia cytokin prozapalnych (np. IL- β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-17). Zarówno stany zapalne, jak i immunosenescencja odgrywają główną rolę w rozwoju chorób związanych z wiekiem, jednak ostatnie odkrycia sugerują, że mogą

str. 1

one również służyć jako proces adaptacyjny w trakcie życia jednostki. Co więcej, pozostaje niejasne, czy ilościowe i jakościowe zmiany w komórkach odpornościowych wynikają z procesu starzenia, czy też są adaptacją do trwającej całe życie ekspozycji na patogeny. Do niedawna zakładano, że starzenie się prowadzi do chorób związanych z wiekiem, takich jak choroby sercowo-naczyniowe i neurodegeneracyjne. Ich występowanie korelowało ze zmianami w układzie odpornościowym związanymi z wiekiem (immunosenescencja). Odpowiedź na szczepionki u osób starszych pozostaje odpowiednia w porównaniu z osobami młodymi, podobnie jak odpowiedź na inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych, nawet w starszym wieku. Dlatego też związane z wiekiem zmiany w układzie odpornościowym odzwierciedlają raczej jego adaptację do presji czynników środowiskowych. Prawie wszystkie wyżej wymienione zmiany w parametrach odpornościowych wydają się mieć jeden wspólny mianownik, którym jest stres proliferacyjny. Można to po prostu opisać jako zwiększone zapotrzebowanie na replikację komórkową ze względu na konieczność zwalczania patogenów, procesy autoimmunologiczne, gojenie się ran, wzrost, zastępowanie starzejących się komórek.

Zjawisko to dotyczy również regeneracji hematopoezy w przypadku przeszczepienia allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HCT). Wprowadzenie allo-HCT jako terapii wielu złośliwych i niezłośliwych chorób stworzyło doskonałą platformę do badania ludzkiej immunologii i starzenia się komórek. Kluczowym aspektem allo-HCT jest odtworzenie całej hematopoezy u biorcy ze stosunkowo niewielkiej ($2-5 \times 10^6/\text{kg}$) liczby komórek macierzystych krwiotworzenia dawcy. W ten sposób przeszczepione komórki są narażone na ogromny stres proliferacyjny w porównaniu z identycznymi komórkami, które pozostają w układzie dawcy. Część immunologiczna układu krwiotwórczego jest szczególnie narażona na stres proliferacyjny, ponieważ jest również stymulowana przez różnice między antygenami zgodności tkankowej biorcy i dawcy, co prowadzi do reakcji przeszczep przeciwko chorobie (będącej powodem wykonania transplantacji), ale również chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD). Objawy GvHD są podobne do występujących w chorobach autoimmunizacyjnych, prowadząc do uszkodzenia narządów biorcy. Celem zapobiegania rozwojowi i kontroli/eliminacji GvHD podaje leki immunosupresyjne zaburzające proliferację limfocytów B (inhibitory kalcyneuryny, metotreksat). Limfocyty T dawcy odgrywają kluczową rolę w GvHD, jednak limfocyty B są również ważne do jej rozwoju, zwłaszcza postaci przewlekłej (cGvHD). To zaangażowanie limfocytów w ww. procesy powoduje ich b. nasiloną proliferację, co może przyczyniać się do przyspieszonego

skracania telomerów. Ponadto biorcy allo-HCT mają zwiększoną podatność na powikłania infekcyjne, które powodują dodatkowy stres proliferacyjny komórek odpornościowych.

Stąd też Doktorant (wraz z wymienionymi współpracownikami i promotorem) postawił hipotezę badawczą, że potomstwo krwiotwórczych komórek macierzystych dawcy u biorców allo-HCT ulega przyspieszonemu starzeniu. W ocenianej rozprawie doktorskiej starano się odpowiedzieć na pytanie, czy długoterminowi biorcy allo-HCT są „starsi” na poziomie molekularnym niż ich dopasowani dawcy allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych.

Stąd też głównymi celami rozprawy doktorskiej były:

1. Porównanie długości telomerów czterech głównych subpopulacji limfocytów (TCD4⁺, TCD8⁺, limfocytów B i komórek NK) długoletnich biorców i dawców allo-HCT.
2. Porównanie immunofenotypu biorców długoletnich i dawców allo-HCT.
3. Porównanie stężeń cytokin prozapalnych u biorców długoletnich i dawców allo-HCT.
4. Ocena, czy wyżej wymienione parametry różnią się między biorcami pogrupowanymi według statusu ryzyka cGvHD i zakażenia.

Praca doktorska składa się z dwóch artykułów oryginalnych, prezentujących wyniki uzyskane w trakcie badania oraz jednego artykułu przeglądowego. Artykuły oryginalne opisują zmiany w długości telomerów, immunofenotypie i stężeniach cytokin prozapalnych u biorców allo-HCT w porównaniu z ich dawcami oraz zmiany w molekularnych cechach starzenia

i różnice w tych parametrach między biorcami pogrupowanymi według ich statusu ryzyka zakażenia i statusu HIV. Artykuł przeglądowy podsumowuje aktualny stan wiedzy na temat wpływu stresu proliferacyjnego, zarówno fizjologicznego, jak i jatrogennego, na starzenie się układu odpornościowego, odzwierciedlone przez immunosenescencję i stany zapalne.

Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej to:

1. Michał Cezary Czarnogórski, Justyna Sakowska, Mateusz Maziewski, Maciej Zieliński, Agnieszka Piekarska, Igor Obuchowski, Mikołaj Młyński, Magdalena Dutka, Alicja Sadowska-Klasa, Ewa Zarzycka, Maria Bieniaszewska, Piotr Trzonkowski, Jacek M. Witkowski, Andrzej Hellmann, Katarzyna Ruckemann-Dziurdzińska, Jan M. Zaucha. Ageing-resembling phenotype of long-term

- allogeneic hematopoietic cells recipients compared to their donors. *Immunity & Ageing* 2022;19(1): 51. Impact Factor: 9,701, punkty MEiN: 100.
2. Czarnogórski M, Maziewski M, Ruckemann-Dziudzińska K, Sakowska J, Zieliński M, Witkowski J, et al. Long-term allogeneic hematopoietic cells transplantation survivors' proinflammatory cytokine profiles compared to their respective donors and immunophenotype differences depending on GvHD history and infection status. *Acta Haematologica Polonica* 2023; nr 2, vol 54: 86-92. Impact Factor: 0, punkty MEiN: 100.
 3. Michał Cezary Czarnogórski, Jacek M. Witkowski, Jan M. Zaucha. Impact of proliferative stress on both adaptive and innate immune response. *Journal of Transfuzion Medicine* 2023, vol. 16, nr 2. Impact Factor:), punkty MEiN: 20.

Łączna wartość Impact Factor: 9,701

Łączna liczba punktów MEiN: 220

W dołączonym do dokumentacji przewodu doktorskiego oświadczeniu lek. Michał Cezary Czarnogórski jako autor pracy: "Ageing-resembling phenotype of long-term allogeneic hematopoietic cells recipients compared to their donors" wskazuje, iż jego własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

- konceptualizacja pracy
- pozyskanie finansowania
- rekrutacja pacjentów
- akwizycja danych klinicznych
- izolacja PBMC
- pozyskanie osocza i surowicy
- izolacja limfocytów oraz wykonanie immunofenotypu
- analiza statystyczna
- napisanie manuskryptu

Całkowity wkład własny DOKTORANT podaje na: 60% (w pracy nr 1 i nr 2) oraz 80% w pracy przeglądowej, w tym przypadku udział lek. Michała Cezarego Czarnogórskiego w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował: konceptualizację pracy oraz napisanie manuskryptu.

Wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Michała Cezarego Czarnogórskiego jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczyli, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Michała Cezarego Czarnogórskiego przy opracowywaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Praca uzyskała wsparcie finansowe- Granty Narodowego Centrum Nauki, Polska (nr 2018/31/N/NZ3/01035 i 2019/03/X/NZ3/01848).

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Etyki przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym - NKBBN/394-594/2019 i NKBBN/394-45/2020. Każdy uczestnik podpisał formularz świadomej zgody na udział w badaniu.

We **wstępie** lek. Michał Cezary Czarnogórski (i wsp.) szczegółowo omawia aktualny stan wiedzy na temat procesów starzenia się, które jest uniwersalnym zjawiskiem biologicznym, wpływającym na prawie wszystkie komórki w większości żywych organizmów. Nie istnieje jednak uniwersalna definicja starzenia się ze względu na jego złożoność. Można je opisać jako wysoce heterogeniczny proces, który wpływa na wszystkie tkanki i układy, prowadząc do stopniowej utraty funkcji.

Postawione **cele pracy** należy uznać za godne realizacji.

Pacjenci i Metody

Przedstawiono szczegółowy opis przebiegu badania. Oceniono 20 par dawców (D) i spokrewnionych z nimi biorców (R). dawców (R) poddanych allo-HCT co najmniej ponad 12 lat temu (długotrwale przeżywający) w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym, Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Liczba par (20) była ograniczona przez ogólną śmiertelność związaną z procedurą i dostępnością długoterminowych pacjentów, którzy przeżyli. Dla każdej pary biorca-dawca pobrano próbkę 50 ml pełnej krwi żyłnej z antykoagulantem (EDTA), w każdym punkcie czasowym.

Wyniki

Artykuł 1

Artykuł zatytułowany **"Ageing-resembling phenotype of long-term allogeneic hematopoietic cells recipients compared to their donors"**, opublikowany w **Immunity & Ageing BMC**, przedstawia wyniki analizy porównawczej długości telomerów w głównych subpopulacjach limfocytów i immunofenotypu biorców i dawców allo-HCT oraz różnice między biorcami, gdy są pogrupowani według statusu cGvHD: (GvHD (+) i GvHD (-)) i statusu ryzyka infekcji (biorcy niskiego i wysokiego ryzyka). Porównywalne oznaczenie długości telomerów przeprowadzono techniką qPCR na czterech głównych subpopulacjach limfocytów (TCD4+, TCD8+, limfocyty B i komórki NK) wyizolowanych techniką separacji immunomagnetycznej. Stwierdzono, że biorcy wykazują pewne cechy starzenia się w porównaniu z dawcami, tj. skrócone telomery, ale tylko w limfocytach CD8+. Sprawdzono wpływ płci i wieku dawców na średnią długość telomerów u biorców i nie stwierdzono żadnej korelacji. W przypadku populacji komórek CD8+ wiek dawcy był odwrotnie skorelowany ze średnią długością telomerów dawców. Również liczba podanych komórek CD34+ była odwrotnie skorelowana ze średnią długością telomerów komórek CD8+ biorców. Stwierdzono również, że limfocyty biorcy mają fenotyp przypominający starzenie się, tj. mniejszy odsetek limfocytów TCD4+ i naiwnych limfocytów TCD4+, a także limfocytów B1 i większy odsetek efektorowych komórek pamięci TCD4+, limfocytów CD8+ Eomes, komórek CD19+ i limfocytów B2 w porównaniu z ich odpowiednimi dawcami. Mediana stosunku CD4+/CD8+ była wyższa u dawców niż u biorców allo-HCT. Różnice w immunofenotypie badano również u biorców podzielonych ponownie na dwie grupy: niskiego i wysokiego ryzyka zakażenia. Stwierdzono istotne różnice w odsetku komórek NK (CD56+), który był wyższy u biorców niskiego ryzyka zakażenia. Wyniki uzyskane w artykule sugerują, że limfocyty biorcy wykazują pewne cechy starzenia się w porównaniu z limfocytami dawcy (skrócone telomery w limfocytach CD8+ i zmiany ilościowe w subpopulacjach limfocytów). Historia niższej liczby infekcji u biorców allo-HCT wydaje się być związana ze zwiększonym odsetkiem komórek NK, co podkreśla rolę wrodzonej odpowiedzi immunologicznej jako podstawowego mechanizmu obronnego przed patogenami w tej grupie chorych. Historia GvHD nie wpływa na tempo starzenia się. Dlatego obserwowane różnice między limfocytami biorców i dawców najprawdopodobniej wynikają z ogromnego stresu proliferacyjnego we wczesnym okresie po allo-HCT oraz, w pewnym stopniu, z różnicy między mikrośrodowiskiem dawców i biorców, która jest jedyną inną zmienną, która może wpływać na identyczne komórki, pochodzące z tych samych progenitorów uzyskanych od dawcy.

Artykuł 2

Artykuł zatytułowany „**Long-term allogeneic hematopoietic cells transplantation survivors' proinflammatory cytokine profile compared to their respective donors and immunophenotype differences depending on GvHD history and infection status**”, opublikowany w **Acta Haematologica Polonica, Via Medica**, przedstawia wyniki analizy profilu cytokin prozapalnych u biorców allo-HCT w porównaniu z ich odpowiednimi dawcami, różnice immunofenotypowe i stężenia cytokin prozapalnych między biorcami pogrupowanymi według ryzyka zakażenia i statusu GvHD, Stężenia cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α i IL-17) biorców i dawców allo-HCT oceniano za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów FlexSets z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej, a także oceny immunofenotypu. Nie stwierdzono żadnych istotnych różnic w stężeniach cytokin prozapalnych, ani między biorcami i dawcami w ogóle, ani między biorcami pogrupowanymi według statusu ryzyka zakażenia. Dlatego te wyniki nie potwierdzają początkowej hipotezy badawczej, że procedura allo-HCT prowadzi do procesu przypominającego stan zapalny u biorców. Brak różnic u długoterminowych biorców allo-HCT, gdy są oni pogrupowani według historii cGvHD, może sugerować, że układ odpornościowy ma tendencję do stabilizacji w ciągu kilku lat po transplantacji.

Artykuł 3

Artykuł przeglądowy zatytułowany "**Wpływ stresu proliferacyjnego na adaptacyjną i wrodzoną odpowiedź immunologiczną**", opublikowany w **Journal of Transfusion Medicine, Via Medica**, podsumowuje aktualny stan wiedzy na temat wpływu stresu proliferacyjnego, zarówno fizjologicznego, jak i jatrogennego, na wrodzoną i adaptacyjną odpowiedź immunologiczną, wpływając na dwie główne cechy starzenia się układu odpornościowego, a mianowicie - stan zapalny i immunosenescencję.

We wnioskach Doktorant i wsp. stwierdzają

1. Częściowo potwierdziliśmy naszą początkową hipotezę o większym skróceniu telomerów u biorców allo-HCT w porównaniu z ich odpowiednimi dawcami w subpopulacjach TCD8+, TCD4+ i limfocytach B, chociaż tylko w TCD8+ nasze wyniki osiągnęły istotność statystyczną. Nie stwierdzono różnicy w komórkach NK, Silna różnica między biorcami i dawcami w subpopulacji

CD8+ może wynikać z szybszej rekonstrukcji limfocytów CD8+ w krótkim okresie po transplantacji. Brak różnic w długości telomerów między biorcami i dawcami w komórkach NK może wynikać z faktu, że są one pierwszymi komórkami, które proliferują w okresie rekonstrukcji układu krwiotwórczego i mogą osiągnąć prawidłowe wartości w ciągu miesiąca po allo-HCT. Wiek, płeć, status ryzyka infekcji i przewlekła GvHD wydają się nie mieć wpływu na długość telomerów biorców. W związku z tym wnioskujemy, że zwiększone skracanie telomerów u biorców allo-HCT występuje z powodu zwiększonego zapotrzebowania na proliferację komórek krwiotwórczych w okresie rekonstrukcji i stabilizuje się wcześniej po początkowym przyspieszeniu po przeszczepie i nie mają na nie wpływu powikłania po przeszczepie.

2. Immunofenotyp biorców allo-HCT w porównaniu z ich odpowiednimi dawcami ma pewne podobieństwa do immunofenotypu osób w wieku fizjologicznym

i dlatego można go określić jako przypominający starzenie się. Różnice obejmowały zwiększony odsetek komórek pamięci efektorowej TCD4+, komórek TCD8+ Eomes, komórek CD19+ i limfocytów B2 oraz zmniejszony odsetek limfocytów TCD4+, komórek naiwnych TCD4+ i limfocytów B1. Co więcej, stwierdziliśmy, że nawet po ponad dekadzie od przeszczepu, biorcy allo-HCT mają obniżony stosunek CD4/CD8+, który jest powszechnie spotykany u osób starszych. Stwierdziliśmy, że przewlekła GvHD nie wpływa znacząco na fenotyp biorców w porównaniu z ich dawcami. Chociaż, po pogrupowaniu według statusu ryzyka infekcji, stwierdziliśmy, że biorcy o niskim ryzyku infekcji mieli wyższy odsetek komórek NK w porównaniu z biorcami o wysokim ryzyku infekcji. Może to sugerować kluczową rolę wrodzonego układu odpornościowego w ochronie przed infekcjami u biorców allo-HCT.

3. Co zaskakujące, nie stwierdziliśmy różnic w stężeniach cytokin prozapalnych między biorcami, którzy przeżyli allo-HCT i ich dawcami. Co więcej, nie było różnic w stężeniach cytokin prozapalnych między biorcami pogrupowanymi według statusu ryzyka infekcji. Zaprzecza to naszej początkowej hipotezie, że allo-HCT indukuje proces przypominający stan zapalny i sugeruje, że przeszczep nie prowadzi do przewlekłego, jałowego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia. Co dziwne, stężenia cytokin prozapalnych

u biorców, którzy mieli historię GvHD, które składają się na przewlekły stan zapalny, również nie różniły się od biorców, u których nie wystąpiła GvHD. Sugeruje to, że allo-HCT *per se* nie wpływa na odpowiedź zapalną, indukowaną najprawdopodobniej przez przewlekłą stymulację antygenową przez całe życie jednostki.

Wnioski stanowią odpowiedzi na postawione cele pracy.

W Omówieniu wyników i dyskusji Autor w sposób zwięzły i szczegółowy ocenia uzyskane przez siebie wyniki i porównuje je z rezultatami badań przeprowadzonych, opublikowanych przez innych lekarzy.

Piśmiennictwo jest dobrane właściwie, w zdecydowanej większości pochodzi z ostatnich 10 lat.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że stanowi ona kolejny krok w zrozumieniu zjawisk następujących w układzie odpornościowym po wykonaniu procedury przeszczepienia allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych.

W pracy lekarz Michał Cezary Czarnogórski wykazał się znajomością warsztatu jakim powinien się posługiwać pracownik naukowy- lekarz.

Ograniczenie pracy stanowi stosunkowo mała liczebność badanej grupy.

Niedoskonałość stanowi niejednorodny sposób cytowania prac stanowiących cykl wchodzący w skład rozprawy doktorskiej!

Moja recenzja jest pozytywna.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.).

Uważam, że lek Michał Czarnogórski powinien być dopuszczony do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie dziękuję za przywilej recenzowania tej pracy.