

**Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi
i Transplantacji Szpiku
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
51-537 Wrocław, Wyb. L. Pasteura 4**

Wrocław, 31.10.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Michała Cezarego Czarnogórskiego pt.
“Ageing of long-term allogeneic hematopoietic cells recipients compared to their
donors”**

Przedstawioną mi do oceny Rozprawę Doktorską stanowi cykl trzech prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach z listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa (MNiSW), których lek med. Michał Cezary Czarnogórski jest pierwszym Autorem. Rozprawa doktorska ma formę zwartej opracowania, do którego zostały włączone publikacje wchodzące w jej skład.

Oceniany cykl prac składa się z dwóch prac oryginalnych i jednej pracy poglądowej, o sumarycznej liczbie 220 punktów MNiSW. Dwie prace oryginalne wchodzące w skład cyklu zostały opublikowane w czasopismach, którym MNiSW przyznało po 100 punktów, a dodatkowo jedna z tych prac została opublikowana w czasopiśmie „Immunity and Aging” posiadającym Współczynnik Wpływu (Impact Factor) równy 9,701.

Przed opublikowaniem pełnotekstowych prac Doktorant prezentował wyniki swoich badań na międzynarodowych prestiżowych konferencjach, w tym na konferencji Europejskiego Towarzystwa Hematologicznego (EHA) w 2022 roku oraz amerykańskiego Towarzystwa Hematoonkologicznego (SOHO) w 2020 roku, uzyskując grant na uczestnictwo w konferencji SOHO z Programu dla Młodych Badaczy.

Zwarte opracowanie stanowiące rozprawę doktorską liczy 26 stron i posiada typowy, ogólnie przyjęty układ, na który składają się streszczenia w języku angielskim i polskim poprzedzone zestawieniem zastosowanych w opracowaniu skrótów, lista opublikowanych prac stanowiących cykl publikacyjnych, oraz rozdziały: wstęp, cele pracy, wyniki, wnioski i piśmiennictwo. Do opracowanie dołączono również kopie opublikowanych prac.

Doktorant nie dołączył do opracowania kopii pozytywnej opinii odpowiedniej Komisji Bioetycznej, jednak informację o takiej zgodzie można znaleźć w opublikowanych pracach oryginalnych (Komisja Bioetyczna przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym- NKBBN/394-594/2019 oraz NKBBN/394-45/2020).

Publikacje włączone do rozprawy doktorskiej są spójne tematycznie i dotyczą zjawisk starzenia się układu immunologicznego dawcy w organizmie biorcy po transplantacji allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT).

Allo-HSCT stanowi oryginalny model do badania zjawisk starzenia się komórek układu immunologicznego, ponieważ przeszczepione komórki krwiotwórcze dawcy poddane zostają nasilonemu stresowi proliferacyjnemu w organizmie biorcy, zwłaszcza we wczesnym okresie po transplantacji. Doktorant słusznie założył, że poddanie przeszczepionych HSC znacznie zwiększonym wymaganiom proliferacyjnym w porównaniu do stanu fizjologicznego oraz prozapalne zmiany mikrośrodowiska wynikające z powikłań po transplantacji, przede wszystkim choroby przeszczep-przeciw-gospodarzowi (GvHD) i infekcji, mogą przyczyniać się do przyspieszonego starzenia się komórek układu immunologicznego dawcy w organizmie biorcy. Zjawiska związane ze starzeniem się układu immunologicznego opisywane są w literaturze anglojęzycznej pod nazwami „immunosenescence” czyli postępujące upośledzenie funkcji układu immunologicznego wraz z postępującymi zmianami ilościowymi w subpopulacjach limfocytów oraz „immunaging” czyli przyspieszone starzenia się układu immunologicznego w wyniku przewlekłego nieinfekcyjnego stanu zapalnego o nieznacznym nasileniu, nazywane czasami w polskiej literaturze „starczym zapaleniem”. Podjęta przez Doktoranta praca naukowa zmierzała do poszerzenia wiedzy na temat tych zjawisk i patomechanizmów odpowiedzialnych za ich postęp.

Doktorant postawił sobie za cel ustalenie, czy u ozdowieńców po allo-HSCT cechy molekularne, immunofenotypowe i czynnościowe starzenia się komórek układu immunologicznego wyrażone są w większym stopniu niż u dawców, od których pozyskano HSC do allotransplantacji.

Podjęty przez Doktoranta temat jest ważny i niezwykle ciekawy. Porównanie po wielu latach od allo-HSCT układu immunologicznego dawcy i biorcy stanowi bowiem unikalny biologicznie model dla badania zjawisk związanych ze starzeniem się komórek układu immunologicznego i czynników wpływających na te zjawiska.

Badana przez Doktoranta grupa stanowiła 20 par dawca-biorca, u których po co najmniej 10 latach od allo-HSCT badano długość telomerów i immunofenotyp głównych subpopulacji limfocytów, a także stężenie prozapalnych i przeciwzapalnych cytokin. Powyższe parametry

porównywano następnie między chorymi, u których rozwinęła się przewlekła GvHD, a chorymi, którzy nie doświadczyli tego powikłania, a także między grupami chorych wyodrębnionymi na podstawie liczby przebytych infekcji po transplantacji.

Doktorant badał długość telomerów techniką qPCR w głównych subpopulacjach limfocytów (T CD4+, T CD8+, B i NK) wyizolowanych metodą selekcji immunomagnetycznej, wykazując że jedynie w subpopulacji limfocytów T CD8+ długość telomerów u biorców HSC jest krótsza niż u dawców. Ponadto Doktorant udokumentował, że długość telomerów w subpopulacji limfocytów T CD8+ koreluje odwrotnie z wiekiem dawcy HSC, a także z liczbą przeszczepionych komórek CD34, co stanowi niezwykle ciekawą obserwację. Dodatkowo Doktorant wykazał, że odsetek limfocytów T CD4+ ogółem i naiwnych limfocytów T CD4+, oraz limfocytów B1 jest niższy u biorców niż u dawców, natomiast odsetek limfocytów T o fenotypie efektorowych komórek pamięci immunologicznej, limfocytów T CD8+ z ekspresją czynnika transkrypcyjnego EOMES oraz limfocytów B2 jest wyższy, podobnie jak wskaźnik CD4+:CD8+. Autor podsumował uzyskane wyniki wnioskiem, że stwierdzone zmiany odpowiadają fenotypowi związanemu ze starzeniem się układu immunologicznego. Autor nie stwierdził natomiast, aby przebyta przewlekła GvHD miała wpływ na badane parametry. Przebyte infekcje po transplantacji były związane wyłącznie z odsetkiem komórek NK, tj. u chorych z mniejszą liczbą powikłań infekcyjnych odsetek komórek NK był wyższy niż u chorych z przebytymi po transplantacji licznymi zakażeniami.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki wskazują na kluczową rolę stresu proliferacyjnego w przedwczesnym starzeniu się komórek układu immunologicznego dawcy w organizmie biorcy. Ta część uzyskanych przez Doktoranta niezwykle ciekawych wyników i wniosków z nich wypływających stała się podstawą do opublikowania pracy pt. „Ageing-resemble phenotype of long-term allogeneic hematopoietic cells recipients compared to their donors” w cenionym czasopiśmie *Immunity and Ageing* w 2022 roku.

Doktorant stwierdził również, że stężenie osoczowe prozapalnych (IL-1beta, IL-4, IL-6, TNF-alfa, IL-17F) i przeciwzapalnych (IL-10) cytokin, które badał z zastosowaniem komercyjnego testu FlexSets i techniki cytometrii przepływownej, jest podobne u dawców i biorców, a ponadto stężenie cytokin nie wykazuje związku z przebytymi po allo-HSCT infekcjami, ani z przewlekłą GvHD. Wyniki te potwierdziły wniosek sformułowany we wcześniej cytowanej pracy dotyczący braku długotrwałego wpływu allo-HSCT na proces tzw. starczego zapalenia u biorcy. Ta część wyników wraz z płynącymi z nich wnioskami została opublikowana przez Doktoranta w oficjalnym czasopiśmie Polskiego Towarzystwa Hematologii i Transfuzjologii, tj. w *Acta Haematologica Polonica* w 2023 roku.

Udokumentowaniem szerokiej wiedzy Doktoranta na temat starzenia się komórek układu immunologicznego, stresu proliferacyjnego oraz związku tych zjawisk z allo-HSCT jest praca pogładowa opublikowana przez Autora w czasopiśmie Journal of Transfusion Medicine w 2023 roku, w której Doktorant poza szerokim przedstawieniem aktualnego stanu wiedzy w oparciu o bieżące piśmiennictwo sprawnie podsumował i kompetentnie poddał dyskusji wcześniej opublikowane wyniki własnych badań.

Po wnikliwej lekturze Rozprawy Doktorskiej z przyjemnością stwierdzam, że przedstawiony mi do oceny cykl publikacji jest spójny tematycznie i stanowi oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego. Cykl publikacji zawiera artykuły opublikowane w czasopismach z części A wykazu czasopism naukowych MNiSW, w których Doktorant jako ich pierwszy Autor wykazał się dojrzałością naukową, umiejętnością korzystania z piśmiennictwa, planowania badań, ich realizacji z doborem odpowiednich metod badawczych oraz krytycznej analizy poczynionych obserwacji.

Podsumowując, przedłożona mi do recenzji Rozprawa Doktorska lek. med. Michała Cezarego Czarnogórskiego "Ageing of long-term allogeneic hematopoietic cells recipients compared to their donors", w której skład wchodzi trzy publikacje spełnia wszystkie metodologiczne, merytoryczne i formalne wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Przedstawioną Rozprawę Doktorską oceniam wysoko i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. med. Michała Cezarego Czarnogórskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Czyż
prof. dr hab. n. med.