

AUTOREFERAT

dr n. med. Lucyna Ewa Kaszubowska

Katedra i Zakład Histologii

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2019

1. Imię i nazwisko: Lucyna Ewa Kaszubowska

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

1995 – magister biologii, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii
specjalność: biologia molekularna

Tytuł pracy magisterskiej: „**Oczyszczanie oraz wstępna charakterystyka endonukleazy restrykcyjnej TaqII wyizolowanej ze szczepu *Thermus aquaticus* YT1**”.

Promotor: Prof. dr hab. Anna Podhajska

2000 – doktor nauk medycznych, Akademia Medyczna w Gdańsku, Wydział Lekarski,
specjalność: biologia medyczna

Tytuł rozprawy doktorskiej: „**Wpływ czynnika martwicy nowotworu (TNF) i jego receptorów na proces apoptozy w komórkach linii nowotworowej U937**”

Promotor: Prof. dr hab. Jacek Bigda

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1995-1996 – starszy referent techniczny w Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku, zatrudnienie w ramach programu TEMPUS, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG

1996-2000 – doktorant Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego, praca doktorska wykonywana w Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku w ramach Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG

I-IX.2000 – asystent w Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku

2000-2013 – adiunkt w Katedrze Histologii i Immunologii (do 2010 r.) / Katedrze i Zakładzie Histologii (od 2010 r) Akademii Medycznej w Gdańsku (do 2009) r. / Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (od 2009 r.)

2013 do chwili obecnej – starszy wykładowca w Katedrze i Zakładzie Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Rola białek ochronnych SIRT1, HSP70 i SOD2 w modelowaniu stanu czynnościowego ludzkich komórek NK w procesie starzenia

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem 4 oryginalnych prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)*, o łącznej punktacji:

IF = 14,324

MNiSW = 100

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

1. **Lucyna Kaszubowska**, Jan Jacek Kaczor, Łukasz Hak, Agnieszka Dettlaff-Pokora, Magdalena Szaryńska, Zbigniew Kmieć (2011). *Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly*. J. Physiol. Pharmacol. 2011; vol. 62, nr 1, s. 101-109.

Mój udział procentowy szacuję na: 60%

Punktacja IF: 2.267

Punktacja ministerstwa: 25.000

2. **Lucyna Kaszubowska**, Jerzy Foerster, Jan J. Kaczor, Daria Schetz, Tomasz Jerzy Ślebioda, Zbigniew Kmieć (2017). *Expression of cellular protective proteins SIRT1, HSP70 and SOD2 correlates with age and is significantly higher in NK cells of the oldest seniors* Immun. Ageing 2017; 14:3.

Mój udział procentowy szacuję na: 65%

Punktacja IF 4.019

Punktacja ministerstwa 25.000

3. **Lucyna Kaszubowska**, Jerzy Foerster, Jan Jacek Kaczor, Daria Schetz, Tomasz Jerzy Ślebioda, Zbigniew Kmieć (2018). *NK cells of the oldest seniors represent constant*

and resistant to stimulation high expression of cellular protective proteins SIRT1 and HSP70.
Immun. Ageing 2018; 15:12

Mój udział procentowy szacuję na: 70%

Punktacja IF 4.019

Punktacja ministerstwa 25.000

4. Lucyna Kaszubowska, Jerzy Foerster, Daria Schetz, Zbigniew Kmiec. *CD56bright cells respond to stimulation until very advanced age revealing increased expression of cellular protective proteins SIRT1, HSP70 and SOD2.* Immun. Ageing 2018, 15:31

Mój udział procentowy szacuję na: 80%

Punktacja IF 4.019

Punktacja ministerstwa 25.000

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

WPROWADZENIE

Komórki NK (ang. natural killer cells) należą do limfoidalnych komórek odporności wrodzonej o kluczowej roli w przypadku infekcji wirusowych i odpowiedzi przeciwnowotworowej [1]. Charakteryzują się ekspresją glikoproteiny CD56 i w zależności od jej poziomu wyróżnia się dwie subpopulacje komórek: komórki CD56dim i CD56bright. Populacja komórek CD56bright stanowi około 10% populacji komórek NK i pełni funkcję komórek o charakterze immunoregulatorowym wydzielając: IFN γ , TNF, IL-10, IL-13, GM-CSF [2]. Komórki CD56dim to efektorowe komórki cytotoksyczne stanowiące większość populacji komórek NK (90%), które również mogą wydzielać IFN- γ po wcześniejszej stymulacji [3] [4]. Liczba komórek NK i stosunek liczby komórek CD56dim / CD56bright zwiększa się z wiekiem [5] [6]. Limfocyty NK należą do komórek odporności wrodzonej, ale mogą wykazywać także pewne cechy charakterystyczne dla komórek odporności nabytej, tzn. mogą dostosowywać się do zmieniających się warunków środowiska komórkowego i rozwijać rodzaj antygenowo specyficznej pamięci immunologicznej [7] [8]. Po stymulacji za pomocą cytokin, np. IL-2, IL-12, IL-15 i IL-18 lub w wyniku oddziaływania z komórkami docelowymi wydzielają szereg cytokin: TNF, IFN- γ , IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF i chemokin: IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β i RANTES oddziałujących na inne komórki organizmu, w tym na komórki układu odpornościowego takie jak monocyty / makrofagi, limfocyty T, limfocyty B i

komórki dendrytyczne [9] [10]. W biologii komórek NK szczególną rolę odgrywa IL-2, która stymuluje te komórki do proliferacji i wydzielania IFN- γ , co zresztą jest wykorzystywane np. przez komórki Treg do regulowania funkcji limfocytów NK poprzez kontrolę biodostępności IL-2 [11].

Proces starzenia układu immunologicznego związany jest z jego kompleksową przebudową wraz z wiekiem. Dotyczy to zwłaszcza odpowiedzi swoistej, co związane jest z inwolucją grasicy, spadkiem liczebności populacji naiwnych limfocytów T, spadkiem całkowitej liczby limfocytów B i T oraz rozregulowaniem systemu odpowiedzi Th1/Th2 [12] [13]. Odpowiedź nieswoista wydaje się pozostać lepiej zachowana podczas procesu starzenia, co przejawia się między innymi wzrostem liczebności populacji komórek NK o zachowanej aktywności cytotoksycznej [14]. Proces starzenia związany jest także z występowaniem przewlekłego stanu zapalnego wynikającego z zaburzenia mechanizmów kontrolujących procesy utrzymujące równowagę pomiędzy odpowiedzią prozapalną i przeciwzapalną. W surowicy obserwuje się wówczas podwyższone stężenie cytokin prozapalnych takich jak TNF, IL-1, IL-6, co powoduje z kolei postępującą aktywację leukocytów, w tym komórek NK i makrofagów [15]. Proces ten w literaturze został określony jako „inflamm-aging” [16]. Towarzyszy mu także podwyższający się z wiekiem poziom stresu oksydacyjnego w komórkach wynikający z dysfunkcji mitochondriów, produkujących większe ilości reaktywnych form tlenu (ROS) w wyniku zaburzonych z wiekiem mechanizmów ochrony antyoksydacyjnej komórki [17]. Wykazano, że w procesie starzenia dochodzi do obniżenia aktywności enzymów zaangażowanych w te mechanizmy, takich jak katalaza, peroksydaza glutationu, dysmutazy ponadtlenkowe [18] [19]. Równowaga pomiędzy procesami pro- i antyoksydacyjnymi przesuwana się z wiekiem w kierunku procesów prooksydacyjnych. Zjawisko to w literaturze opisano jako „oxi-inflamm-aging” [20].

Sirtuina 1 jest białkiem wrażliwym na zmiany potencjału redoks, zaangażowanym w ochronę komórek przed skutkami procesu starzenia wywołanego podwyższonym poziomem stresu oksydacyjnego [21]. Należy do grupy deacetylaz histonowych zależnych od NAD⁺, która odpowiada za aktywność czynników transkrypcyjnych z rodziny FOXO (FOXO1, 3, 4), a także p53, NF- κ B, PGC-1 i HSF-1. Ta grupa czynników transkrypcyjnych kontroluje procesy związane z adaptacyjną odpowiedzią komórki na stres i tym samym wpływa na długość życia [22]. Pod kontrolą czynników transkrypcyjnych FOXO1, FOXO3a i FOXO4 oraz czynnika transkrypcyjnego NF- κ B znajduje się manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (SOD2) należąca do głównych mitochondrialnych antyoksydantów enzymatycznych [23] [24]. Ekspresja białek opiekuńczych z rodziny HSP70 znajduje się z kolei pod kontrolą czynnika

transkrypcyjnego HSF-1 (ang. „heat shock factor-1), który jest aktywowany w ciągu kilku minut od pojawienia się czynnika stymulującego [25] [26].

Proces starzenia układu immunologicznego człowieka został już dosyć dobrze scharakteryzowany, podobnie jak rola, jaką pełnią w nim białka ochronne komórki SIRT1, HSP70 i SOD2 [21] [27] [28]. Natomiast niewiele było do tej pory wiadomo na temat zaangażowania białek ochronnych w procesie starzenia komórek NK, ponieważ nie badano poziomu ekspresji tych białek zarówno w limfocytach NK jak i ich subpopulacjach CD56dim i CD56bright.

Wykaz stosowanych skrótów: cIAP1 (ang. *cellular inhibitor of apoptosis protein 1*) – pierwszy komórkowy inhibitor apoptozy, CRP (ang. *C-reactive protein*) – białko C-reaktywne, ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny, FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*) – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, GM-CSF (ang. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, HSF-1 (ang. *heat shock factor 1*) – czynnik szoku termicznego 1, HSP (ang. *heat shock protein*) - białko szoku termicznego, HSP70^{intr} (HSP70 *intracellular*) – wewnątrzkomórkowe białko HSP70, HSP70^{surf} (HSP70 *surface*) – powierzchniowe białko HSP70, IFN γ – interferon γ , LPS - lipopolisacharyd, MFI (ang. *mean fluorescence intensity*) – średnia intensywność fluorescencji, MIP-1 α (ang. *macrophage inflammatory protein 1 α*) – białko zapalne makrofagów 1 α , NAD (ang. – *nicotinamide adenine dinucleotide*) - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa B*) – czynnik transkrypcyjny NF kappa B, PGC1 (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1*) – receptor gamma aktywowany przez proliferatory peroksysomów, PMA (ang. *phorbol 12-myristate 13-acetate*) – ester forbolu, qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*) – ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy, RANTES (ang. *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*) – chemokina syntetyzowana przez limfocyty T, SIRT1 – sirtuina 1, SOD (ang. *superoxide dismutase*) – dysmutaza ponadtlenkowa, TGF β (ang. *transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostu β , TLR (ang. *Toll-like receptor*) – receptor toll-podobny, TNF – (ang. *tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworu, TNFR (ang. *tumor necrosis factor receptor*) – receptor dla czynnika martwicy nowotworu, TRAF2 (ang. *TNF receptor associated factor 2*) – czynnik 2 związany z receptorem dla TNF, TRAP (ang. *telomeric repeat amplification protocol*) – protokół amplifikacji powtórzeń telomerowych, Treg – limfocyty T regulatorowe, VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyńniowego.

CEL NAUKOWY PRZEDSTAWIONEGO OSIĄGNIĘCIA

Celem przedstawionego osiągnięcia była ocena ekspresji białek ochronnych zaangażowanych w odpowiedź komórki na stres, SIRT, SOD2 i HSP70 w komórkach NK trzech grup wiekowych (młodzi, seniorzy poniżej 85 r.ż i seniorzy powyżej 85 r.ż.) w odniesieniu do różnych warunków stymulacji, z uwzględnieniem wskaźników poziomu stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego. Pierwsza publikacja wchodząca w skład osiągnięcia była pracą wprowadzającą w zagadnienia poruszane w trzech kolejnych. Zaobserwowane w niej zależności pomiędzy parametrami określającymi poziom stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego i stopnia aktywacji komórek NK pozwoliły na postawienie kolejnych pytań badawczych związanych z rolą białek ochronnych w procesie starzenia. W przedstawionych pracach stanowiących osiągnięcie naukowe realizowane były następujące cele szczegółowe:

- ocena zależności występujących pomiędzy parametrami stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego a stanem aktywacji komórek NK w grupie osób młodych, seniorów poniżej 85 r.ż (< 85) i seniorów powyżej 85 r.ż. (> 85);
- analiza ekspresji białek ochronnych SIRT1, SOD2 i HSP70 w niestymulowanych komórkach NK osób młodych, seniorów < 85 i seniorów > 85 w odniesieniu do poziomu wskaźników stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego;
- analiza ekspresji białek ochronnych SIRT1, SOD2 i HSP70 w aktywowanych komórkach NK osób młodych, seniorów < 85 i seniorów > 85 w odniesieniu do poziomu wskaźników stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego;
- analiza ekspresji białek ochronnych SIRT1, SOD2 i HSP70 zarówno w niestymulowanych jak i stymulowanych komórkach CD56dim i CD56bright osób młodych, seniorów < 85 i seniorów > 85.

OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Publikacja 1

Lucyna Kaszubowska, Jan Jacek Kaczor, Łukasz Hak, Agnieszka Dettlaff-Pokora, Magdalena Szaryńska, Zbigniew Kmiec (2011). ***Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly.*** J. Physiol. Pharmacol. 2011; vol. 62, nr 1, s. 101-109. IF 2.267; MNiSW 25.

Celem pierwszej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego była ocena parametrów stanu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego w surowicy osób młodych (średnia wieku 26 lat), seniorów poniżej 85 roku życia (średnia wieku 78 lat) i powyżej 85 roku życia (średnia wieku 91 lat), a następnie analiza zależności występujących pomiędzy nimi oraz stanem aktywacji komórek NK. Grupa seniorów pochodziła z Domu Pomocy Społecznej, z którym Katedra Histologii i Immunologii AMG współpracowała od kilku lat i była to grupa dobrze scharakteryzowana pod względem stanu zdrowia. Osoby młode rekrutowały się spośród studentów i doktorantów Akademii Medycznej w Gdańsku. Uczestnicy projektu nie cierpieli na infekcje ani choroby o charakterze zapalnym i autoimmunologicznym w czasie badań i 6 miesięcy wcześniej. Badania były prowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Gdańsku, a uczestnicy podpisali zgodę na swój udział.

W pracy oznaczano długość telomerów w komórkach NK metodą flow-FISH - parametr wrażliwy zarówno na wzrost poziomu stresu oksydacyjnego w komórce jak i stanu zapalnego w organizmie [29] [30] [31]; stężenie w surowicy grup sulfhydrylowych (grup –SH) - parametr korelujący z zaburzeniami homeostazy redoks; całkowity status antyoksydacyjny w surowicy (TAS – ang. Total Antioxidant Status) oraz stężenie cytokin prozapalnych IL-6 i TNF także w surowicy. Stan aktywacji komórek NK był z kolei oceniany poziomem ekspresji IFN- γ wyrażonym, jako odsetek komórek NK wykazujących ekspresję IFN- γ w analizie cytometrycznej oraz aktywności telomerazy oznaczanej metodą TRAP-ELISA.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że proces starzenia wiązał się ze skracaniem długości telomerów oraz obniżaniem stężenia grup –SH w surowicy, chociaż nie zaobserwowano istotnej różnicy w obu parametrach u seniorów poniżej i powyżej 85 roku życia. Świadczyło to o przewadze procesów prooksydacyjnych zachodzących w komórkach z wiekiem. Potwierdzał to także obniżony całkowity status antyoksydacyjny (TAS) w surowicy seniorów poniżej 85 roku życia. Interesujące było to, że ten parametr nie różnił się istotnie w populacji osób młodych i seniorów powyżej 85 roku życia. Z wiekiem zwiększał się również poziom cytokin prozapalnych w surowicy krwi, zarówno TNF jak i IL-6, chociaż w przypadku IL-6 nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy grupą seniorów poniżej i powyżej 85 roku życia. Komórki NK zarówno w grupie osób młodych jak i w obu grupach seniorów wykazywały wzrost ekspresji IFN- γ po stymulacji PMA (ang. phorbol 12- myristate 13- acetate) z jonomycyną. Ciekawym wynikiem była obserwacja, że wzrost ten był istotnie wyższy w komórkach seniorów w porównaniu z osobami młodymi (ponad dwukrotnie w populacji seniorów < 85 i prawie trzykrotnie w populacji seniorów > 85). Podobnie, komórki NK najstarszych seniorów stymulowane IL-2 wykazywały najwyższy wzrost aktywności telomerazy (prawie 23-krotny) w porównaniu z grupą seniorów < 85 (prawie 5-krotny) i osób

młodych (3,5-krotny). Wzrost wartości obu parametrów po stymulacji komórek NK świadczy o tym, że są one wrażliwe na proces aktywacji nawet w bardzo zaawansowanym wieku, a grupa najstarszych seniorów > 85 nie różni się w tym procesie od grupy seniorów < 85 lub nawet ją przewyższa zdolnością do aktywacji telomerazy po przeprowadzeniu analizy prób zależnych względem komórek niestymulowanych.

Telomery w komórkach NK obu grup seniorów okazały się istotnie krótsze w porównaniu z osobami młodymi, natomiast nie wykryto istotnej różnicy w ich długości pomiędzy grupą seniorów poniżej 85 roku życia i powyżej 85 roku życia. Długość telomerów korelowała pozytywnie ze stężeniem grup sulfhydrylowych ($R = 0,480$) oraz negatywnie ze stężeniem TNF w surowicy ($R = -0,541$).

Ciekawe okazały się także wyniki analizy korelacji pomiędzy oznaczonymi parametrami stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego i stopnia aktywacji komórek NK. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem komórek wykazujących ekspresję IFN- γ i stężeniem grup sulfhydrylowych w surowicy krwi w obu grupach seniorów ($R = 0,666$). Wskazuje to, że niższy poziom stresu oksydacyjnego, który koresponduje z wyższym stężeniem grup sulfhydrylowych w surowicy, koreluje z większą wrażliwością komórek NK na proces aktywacji, a z kolei podwyższony poziom stresu oksydacyjnego może ograniczać zdolność komórek NK do aktywacji, nie tylko w procesie starzenia, ale także podczas innych zaburzeń homeostazy redoks. Podobnie, dodatnią korelację zaobserwowano pomiędzy odsetkiem komórek wykazujących ekspresję IFN- γ i stężeniem IL-6 w surowicy ($R = 0,610$) oraz pomiędzy stężeniem IL-6 w surowicy i aktywnością telomerazy w komórkach NK stymulowanych IL-2 ($R = 0,441$) we wszystkich grupach wiekowych. Obie te zależności potwierdzają fakt, że proces aktywacji komórek NK związany jest z przewlekłym procesem zapalnym o niskim nasileniu, który towarzyszy procesowi starzenia [12] [15].

Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują, że proces zdrowego starzenia fizjologicznego, opisany wcześniej w literaturze jako „successful ageing” [32] [33] związany jest z utrzymaniem równowagi pomiędzy poziomem procesów prozapalnych i przeciwzapalnych w organizmie oraz aktywnością komórkowych mechanizmów ochronnych regulujących poziom stresu oksydacyjnego. Wiąże się to także z utrzymaniem zdolności do aktywacji komórek NK aż do bardzo zaawansowanego wieku.

Wyniki opisane w tej pracy stanowiły również podstawę do przygotowania projektu grantu własnego w 40 konkursie MNiSW pt. „**Rola sirtuiny1 i białek Hsp70 w modelowaniu stanu czynnościowego aktywowanych komórek NK ludzi w podeszłym wieku**”, który uzyskał finansowanie NCN (nr projektu N N404 597640) i był realizowany w latach 2011-2015.

Publikacje nr 2 - 4 z przedstawionego cyklu dotyczyły realizacji grantu N N404 597640. Uczestnicy projektu (grupa seniorów) pochodzili z 5 trójmiejskich Domów Pomocy Społecznej / Domów Seniora. Kryteria wykluczenia obejmowały: CRP > 5 mg/L, choroby nowotworowe, choroby autoimmunologiczne, cukrzycę, infekcje, stosowanie leków immunosupresyjnych, glikokortykosteroidów, niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NSAIDs), otępienie średniego stopnia i otępienie głębokie (MMSE poniżej 23 punktów). Do badań byli kwalifikowani seniorzy samodzielni (ADL 5-6 punktów wg skali Katza).

Natomiast grupa osób młodych rekrutowała się spośród studentów i doktorantów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Publikacja 2

Lucyna Kaszubowska, Jerzy Foerster, Jan J. Kaczor, Daria Schetz, Tomasz Jerzy Ślebioda, Zbigniew Kmiec (2017). *Expression of cellular protective proteins SIRT1, HSP70 and SOD2 correlates with age and is significantly higher in NK cells of the oldest seniors* Immun. Ageing 2017; 14:3. IF 4.019; MNiSW 25.

Druga praca związana była bezpośrednio z realizacją grantu N N404 597640 i przedstawiała pierwszą część uzyskanych wyników. Miała na celu analizę ekspresji białek ochronnych zaangażowanych w odpowiedź komórki na stres (ang. „cellular stress response”): sirtuiny 1 (SIRT1), białek szoku termicznego Hsp70 (HSP70) i manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2) **w niestymulowanych** komórkach NK osób młodych (średnia wieku 21 lat), seniorów poniżej 85 roku życia (średnia wieku 76 lat) i seniorów powyżej 85 roku życia (średnia wieku 88 lat). W pracy oznaczano także stężenie grup karbonylowych i 8-izoprostanów – parametrów wskazujących na poziom stresu oksydacyjnego w komórkach NK badanych grup wiekowych oraz ekspresję cytokin prozapalnych, tzn. TNF i IFN- γ , świadczących o stanie aktywacji komórek NK. Następnie przeprowadzono analizę występujących pomiędzy różnymi parametrami korelacji

dotyczących ekspresji białek ochronnych komórki, parametrów stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego oraz wieku.

Uzyskane wyniki wskazywały, że grupa najstarszych seniorów (> 85) różniła się od pozostałych grup wiekowych; t.j. odpowiednio seniorów < 85 i osób młodych, istotnie podwyższonym odsetkiem komórek wykazujących ekspresję analizowanych białek ochronnych, i.e. SIRT1 ($14,99 \pm 4,04\%$ vs $0,99 \pm 0,69\%$ i $0,46 \pm 0,17\%$), SOD2 ($83,22 \pm 3,92\%$ vs $60,74 \pm 4,66\%$ i $52,91 \pm 3,38\%$) i HSP70 zarówno wewnątrzkomórkowych (HSP70^{intr}) ($76,43 \pm 5,47\%$ vs $34,34 \pm 4,98\%$ i $41,22 \pm 4,17\%$) jak i powierzchniowych (HSP70^{surf}) ($45,14 \pm 7,7\%$ vs $16,67 \pm 2,98\%$ i $13,17 \pm 1,9\%$). Zaobserwowano również dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją SIRT1, SOD2, HSP70^{intr} i HSP70^{surf} a wiekiem ochotników uczestniczących w projekcie (odpowiednio $R = 0,455$; $R = 0,520$; $R = 0,402$; $R = 0,320$), co wskazywało na możliwy związek pomiędzy poziomem ekspresji tych białek a długowiecznością. Dodatkowo odsetek komórek NK z ekspresją SIRT1 wykazywał średnią dodatnią korelację z ekspresją SOD2, HSP70^{intr} i HSP70^{surf} (odpowiednio $R = 0,517$, $R = 0,705$ i $R = 0,439$) oraz słabą z TNF ($R = 0,262$). Ekspresja SOD2 wykazywała również średnią dodatnią korelację z HSP70^{surf} ($R = 0,669$) i z HSP70^{intr} ($R = 0,466$). Natomiast HSP70^{intr} wykazywało dodatnią korelację z HSP70^{surf} ($R = 0,418$) i TNF ($R = 0,263$). Zaobserwowane korelacje wskazują na zaangażowanie badanych białek w różne szlaki sygnałowe w komórce. SIRT1 aktywuje czynniki transkrypcyjne z rodziny FOXO, które odpowiadają za transkrypcję genów odpowiedzi komórkowej na stres, np. SOD2 [23]. Białko to kontroluje także aktywność czynnika transkrypcyjnego HSF1 (ang. „heat shock factor”) zaangażowanego w ekspresję białek opiekuńczych z rodziny HSP70 i HSP90 [34].

W pracy wykazano także korelację dodatnią pomiędzy stężeniem białka CRP w surowicy (białko C reaktywne) a wiekiem ($R = 0,507$). Jego podwyższony poziom w surowicy wskazuje na obecny w organizmie proces zapalny [16]. Pomimo, że w surowicy seniorów zaobserwowano 2-krotnie wyższe stężenie CRP w porównaniu z osobami młodymi, wartości te pozostawały w granicach normy [35]. W przypadku białka C zaobserwowano również dodatnie korelacje pomiędzy jego stężeniem i ekspresją SOD2 i HSP70^{intr} (odpowiednio $R = 0,274$ i $R = 0,292$).

Niestymulowane komórki NK odznaczały się niskim poziomem ekspresji cytokin prozapalnych: TNF (młodzi: $2,15 \pm 0,49\%$; seniorzy < 85: $0,97 \pm 0,19\%$, seniorzy > 85: $1,68 \pm 0,51\%$) i IFN- γ (młodzi: $3,78 \pm 0,42\%$, seniorzy < 85: $3,04 \pm 0,59\%$, seniorzy > 85: $1,52 \pm 0,65\%$). Wyjątek stanowił odsetek komórek z ekspresją IFN- γ , który był istotnie wyższy w populacji osób młodych i korelował ujemnie z wiekiem ($R = -0,254$). Przyczyną mógł być spadek wraz z wiekiem liczebności populacji komórek CD56bright, które są główną

subpopulacją komórek NK zaangażowaną w sekrecję cytokin [36] [37] [38]. Zarówno niskie stężenie CRP w surowicy jak niski odsetek komórek z ekspresją cytokin prozapalnych świadczyły o tym, że badane grupy osób młodych i seniorów, zgodnie z założeniem, były osobami zdrowymi.

Ciekawych wyników dostarczyła też analiza ekspresji TNF i IFN- γ w subpopulacjach komórek NK. Istotnie wyższą ekspresję TNF zauważono w komórkach CD56dim ($2,33 \pm 0,5\%$) w porównaniu do CD56bright ($1,3 \pm 0,44\%$) osób młodych. Ekspresja IFN- γ wykazywała podobną tendencję, ale różnice pozbawione były już istotności statystycznej. Natomiast w grupie seniorów < 85 istotnie wyższą ekspresję TNF zauważono w komórkach CD56bright ($1,39 \pm 0,6\%$) w porównaniu do CD56dim ($0,96 \pm 0,21\%$) i podobną tendencję w przypadku IFN- γ . U najstarszych seniorów uzyskano podobne wyniki do seniorów < 85 zarówno dla TNF jak i IFN- γ , ale bez istotności statystycznej. Komórki CD56dim mogą jednak wykazywać zarówno aktywność cytotoksyczną jak i produkować cytokiny w pewnych warunkach [39], co mogłoby tłumaczyć uzyskane przez nas wyniki. Kolejne prace, które dotyczyły stymulowanych komórek CD56dim i CD56bright wykazały natomiast, że ekspresja IFN- γ po stymulacji zachodzi w różnych przedziałach czasowych w poszczególnych subpopulacjach komórek NK, t.j. wcześniej w komórkach CD56dim i później w komórkach CD56bright [10].

Interesujące było również to, że w przypadku białek ochronnych komórki, to subpopulacja CD56dim wykazywała istotnie wyższą ekspresję SIRT1 i SOD2 w porównaniu z komórkami CD56bright, zarówno u osób młodych jak i seniorów < 85 (SIRT1 dim vs bright, odpowiednio młodzi: $0,51 \pm 0,18\%$ vs $0,43 \pm 0,19\%$ i seniorzy < 85: $1,14 \pm 0,76\%$ vs $0,89 \pm 0,57\%$; SOD2 dim vs bright, odpowiednio: młodzi $55,5 \pm 3,48\%$ vs $42,32 \pm 4,16\%$ i seniorzy < 85: $62,21 \pm 4,73\%$ vs $47,99 \pm 4,73\%$) oraz podobną tendencję u najstarszych seniorów (bez istotności statystycznej). W przypadku białek HSP70^{intr} i HSP70^{surf} nie zauważono różnic istotnych statystycznie pomiędzy ich ekspresją w subpopulacji komórek CD56dim i bright - dotyczyło to wszystkich grup wiekowych.

Stężenie grup karbonylowych i 8-izoprostanów w komórkach NK wszystkich grup wiekowych nie było podwyższone i nie obserwowano tam stresu oksydacyjnego. Populacja osób młodych charakteryzowała się wprawdzie istotnie wyższym stężeniem grup karbonylowych w porównaniu z populacją seniorów < 85 i seniorów > 85, ale wszystkie zmiany mieściły się w granicach normy (odpowiednio: $0,36 \pm 0,04$ nmol/mg białka vs $0,22 \pm 0,02$ nmol/mg i $0,21 \pm 0,03$ nmol/mg białka) [40] [41] [42]. Wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego nie wskazywała także analiza stężenia 8-izoprostanów w komórkach NK, która wykazywała z kolei najwyższe stężenie izoprostanów w populacji najstarszych seniorów w porównaniu z populacją

seniorów < 85 i osób młodych (odpowiednio: $14,22 \pm 4,57$ pg/ml vs $7,59 \pm 2,14$ i $9,26 \pm 2,06$ pg/ml), ale nie były to zmiany istotne statystycznie i mieściły się w granicach normy [43].

Podsumowanie

Do tej pory niewiele było wiadomo o roli białek ochronnych w starzeniu limfocytów NK. Wyniki uzyskane w pracy wskazują, że podwyższony poziom ekspresji SIRT1, HSP70 i SOD2 w komórkach NK najstarszych seniorów wydaje się wiązać z ich długowiecznością. Natomiast zaobserwowane w pracy zależności zachodzące pomiędzy ekspresją poszczególnych białek zaangażowanych w mechanizmy ochronne komórki mogą świadczyć o ich udziale w utrzymywaniu homeostazy układu immunologicznego w procesie zdrowego starzenia (ang. healthy ageing).

Publikacja 3

Lucyna Kaszubowska, Jerzy Foerster, Jan Jacek Kaczor, Daria Schetz, Tomasz Jerzy Ślebioda, Zbigniew Kmiec (2018). *NK cells of the oldest seniors represent constant and resistant to stimulation high expression of cellular protective proteins SIRT1 and HSP70.* Immun. Ageing 2018; 15:12. IF 4.019; MNiSW 25.

Celem badań przedstawionych w kolejnej publikacji była analiza ekspresji białek ochronnych zaangażowanych w odpowiedź komórki na stres: sirtuiny 1 (SIRT1), białek szoku termicznego Hsp70 (HSP70) i manganowej dysmutazy ponadtlenu (SOD2) w **stymulowanych** komórkach NK osób młodych (średnia wieku 21 lat), seniorów poniżej 85 roku życia (średnia wieku 76 lat) i seniorów powyżej 85 roku życia (średnia wieku 88 lat). Komórki były stymulowane IL-2, LPS oraz PMA z jonomycyną, a poziom ekspresji białek ochronnych był porównywany z komórkami niestymulowanymi hodowanymi 48 godz., podobnie jak komórki stymulowane. Analizowano zależności występujące pomiędzy ekspresją poszczególnych białek ochronnych w badanej populacji. Następnie zarówno w komórkach stymulowanych jak i niestymulowanych oznaczano stężenie grup karbonylowych i 8-izoprostanów w celu określenia poziomu stresu oksydacyjnego.

Interleukina 2 jest cytokiną niezbędną do wzrostu limfocytów NK, ich proliferacji oraz aktywacji ścieżki MKK/ERK, która z kolei jest kluczowa dla procesu aktywacji komórek, wydzielania IFN- γ , ekspresji CD25 i CD69 oraz wzmocnienia aktywności cytotoksycznej [44]. Komórki NK mogą być również aktywowane przez lipopolisacharyd (LPS), składnik błony

zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. LPS jest rozpoznawany przez receptory TLR4 (ang. Toll-like receptors 4), które odgrywają istotną rolę w odporności nieswoistej i ulegają ekspresji także na powierzchni komórek NK [45] [46].

PMA (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate) jest aktywatorem kinazy białkowej C (PKC) stosowanym do silnej, niespecyficznego stymulacji komórek NK. Jonomycyna jest z kolei antybiotykiem naśladującym aktywność trójfosforan inozytoli (IP3), który zaangażowany jest w otwieranie kanałów wapniowych. Prowadzi to do zwiększenia stężenia jonów wapnia w cytoplazmie wskutek napływu jonów z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do komórki [47]. PMA z jonomycyną stosowane są zarówno do krótkich (1-6 godz.) stymulacji w celu indukcji ekspresji cytokin, np. IFN- γ [48] [49] jak i do dłuższych (do 48 godz.) w celu analizy ekspresji genów lub białka [50] [51].

W grupie najstarszych seniorów 20% komórek NK niezależnie od tego czy było poddawanych stymulacji czy stanowiło kontrolę, wykazywało podwyższony poziom ekspresji SIRT1 (odsetek komórek z ekspresją SIRT1 mieścił się w przedziale od $19,98\% \pm 5,77\%$ do $21,82 \pm 5,56\%$). W grupie seniorów poniżej 85 r.ż. i osób młodych odsetek komórek z ekspresją SIRT1 był istotnie niższy we wszystkich zastosowanych warunkach doświadczalnych i mieścił się w przedziale odpowiednio od $1,37 \pm 0,77\%$ do $2,22 \pm 1,33\%$ oraz od $0,64 \pm 0,24\%$ do $2,64 \pm 0,8\%$. W przeciwieństwie do innych grup wiekowych komórki NK najstarszych seniorów były niewrażliwe na stymulację. Komórki NK osób młodych były wrażliwe na stymulację za pomocą IL-2 (100 U/ml) i PMA (50 ng/ml) z jonomycyną (500 ng/ml), natomiast w populacji seniorów poniżej 85 r.ż. wykazywały wrażliwość na aktywację za pomocą IL-2 (100 U/ml) i LPS (1 μ g/ml).

Wyniki dotyczące ekspresji SIRT1 w komórkach hodowanych 48godz. odpowiadały tym uzyskanym podczas analizy wykonanej bezpośrednio po izolacji komórek NK z krwi obwodowej [5]. Limfocyty NK wykazywały istotnie wyższy poziom ekspresji SIRT1 u najstarszych seniorów w porównaniu z seniorami poniżej 85 r.ż. i osobami młodymi. Był on nawet wyższy w komórkach hodowanych niż świeżo izolowanych, co mogło być spowodowane podwyższonym poziomem stresu oksydacyjnego w warunkach hodowlanych [52].

Wzór ekspresji HSP70^{intr} w komórkach NK wykazywał podobieństwo do SIRT1, tzn. prawie 40% komórek NK najstarszych seniorów przedstawiało podwyższoną ekspresję HSP70^{intr} niezależnie od warunków stymulacji, a odsetek komórek z ekspresją HSP70^{intr} znajdował się w przedziale od $35,6 \pm 6,8\%$ do $41,7 \pm 6,28\%$. Spośród zastosowanych czynników stymulujących tylko PMA z jonomycyną podwyższała ekspresję wewnątrzkomórkowego

HSP70, co było widoczne w analizie MFI, ale nie zaobserwowano tego już podczas analizy odsetka komórek pozytywnych w tej samej grupie wiekowej. W populacji seniorów poniżej 85 r.ż. i osób młodych poziom ekspresji HSP70^{intr} był dużo niższy i mieścił się w przedziale odpowiednio od $6,87 \pm 2,37\%$ do $13,81 \pm 2,76\%$ i od $3,28 \pm 0,77\%$ do $12,32 \pm 1,34\%$. Podobnie do SIRT1, ekspresja HSP70^{intr} u osób młodych i seniorów < 85 była wrażliwa na stymulację za pomocą IL-2 i PMA z jonomycyną, podczas gdy efekt działania LPS był bardzo ograniczony, nieistotny statystycznie. Pomiędzy tymi dwoma parametrami istniała wysoka dodatnia korelacja zarówno w komórkach niestymulowanych jak i stymulowanych za pomocą IL-2, LPS czy PMA z jonomycyną. Oba parametry wykazywały także dodatnią korelację z wiekiem we wszystkich wariantach stymulacji, poza stymulacją za pomocą IL-2.

Podobnie jak w przypadku SIRT1, wyniki dotyczące ekspresji HSP70^{intr} w komórkach hodowanych 48godz. odpowiadały tym uzyskanym podczas analizy wykonanej bezpośrednio po izolacji komórek NK z krwi obwodowej [5]. Wykazywały istotnie wyższy poziom ekspresji HSP70^{intr} u najstarszych seniorów w porównaniu z seniorami poniżej 85 r.ż. i osobami młodymi. Jednak w przeciwieństwie do SIRT1, wyższy poziom ekspresji białek opiekuńczych był widoczny w komórkach świeżo izolowanych niż hodowanych [5]. Może to wynikać z różnych wzorów transkrypcji charakterystycznych dla genów *SIRT1* i *HSP72*, które znajdują się pod kontrolą innych czynników transkrypcyjnych [21] [25] [26].

Ekspresja SOD2 zarówno w komórkach NK stymulowanych jak i niestymulowanych we wszystkich grupach wiekowych wyglądała nieco inaczej w porównaniu z ekspresją pozostałych białek ochronnych. Limfocyty NK najstarszych seniorów wydawały się wykazywać największą wrażliwość na proces stymulacji. Obserwowano istotny wzrost ekspresji po stymulacji IL-2 (2-krotny) i PMA z jonomycyną (prawie 4-krotny) w porównaniu z komórkami niestymulowanymi ($13,8 \pm 2,69\%$). Komórki NK seniorów poniżej 85 r.ż. były wrażliwe tylko na PMA z jonomycyną wykazując 2-krotny wzrost ekspresji w porównaniu z komórkami niestymulowanymi ($14,0 \pm 3,54\%$). Wyniki analizy MFI w obu grupach wiekowych potwierdzały wyniki uzyskane po analizie odsetka komórek pozytywnych. Podobna analiza wykonana w populacji osób młodych nie wykazała wrażliwości na proces aktywacji, chociaż w analizie MFI zauważono w tej grupie wrażliwość na stymulację za pomocą PMA z jonomycyną.

Ekspresja SOD2 w hodowanych, niestymulowanych komórkach NK była dosyć niska i porównywalna we wszystkich grupach wiekowych. Interesujące okazało się zestawienie wyników z hodowli z wynikami uzyskanymi ze świeżo izolowanych komórek NK, które odznaczały się wyższym poziomem ekspresji tego białka [5]. Taki wzór ekspresji SOD2 może wynikać ze specyfiki kinetyki transkrypcji genu *SOD2*. Wzrost poziomu mRNA

obserwuje się 1-2 godziny po stymulacji, szczyt syntezy następuje po 4-6 godzinach, a potem ekspresja *SOD2* spada [53], co zostało również częściowo opisane przez nasz zespół [54].

Ekspresja HSP70^{surf} po stymulacji zarówno IL-2 jak i LPS zachodziła na bardzo niskim poziomie we wszystkich grupach wiekowych, porównywalnym z poziomem komórek niestymulowanych. Wyjątek stanowiły komórki stymulowane PMA z jonomycyną. Ten zestaw czynników stymulujących zwiększał ekspresję HSP70 na powierzchni komórek NK we wszystkich grupach wiekowych: u młodych 4-krotnie, u seniorów poniżej 85 r.ż. 6-krotnie, a u najstarszych seniorów prawie 16-krotnie w porównaniu do poziomu komórek niestymulowanych, który wynosił odpowiednio: $0,66 \pm 0,27\%$ u młodych, $1,65 \pm 0,76\%$ u seniorów poniżej 85 r.ż. i $1,07 \pm 0,21\%$ u najstarszych seniorów. Podobne wyniki uzyskano w analizie MFI, z wyjątkiem populacji najstarszych seniorów, gdzie analiza HSP70^{surf} wykazała dodatkowo wrażliwość komórek NK na stymulację IL-2. Według Profesor Multhoff, komercyjnie dostępne przeciwciała anti-HSP70 nie są w stanie specyficznie rozpoznać błonowej formy HSP70. Wiążą się one prawdopodobnie do białek HSP70 związanych z receptorami TLR na powierzchni komórek [55]. Celem naszych badań nie była weryfikacja pochodzenia zewnątrzkomórkowej formy białka HSP70, natomiast niezależnie od pochodzenia, ekspresja HSP70 na powierzchni komórek NK ulegała zmianie w zależności od warunków stymulacji ujawniając przy tym korelacje z produkowanymi cytokinami prozapalnymi oraz innymi białkami ochronnymi komórki, w tym z wewnątrzkomórkową formą HSP70.

We wszystkich grupach wiekowych mierzony był także poziom ekspresji cytokin prozapalnych, TNF i IFN- γ w celu oznaczenia stopnia aktywacji komórek NK po stymulacji. Limfocyty NK hodowane 48godz. bez stymulacji wykazywały bardzo niski poziom ekspresji TNF w grupie osób młodych i seniorów poniżej 85 r.ż. i nieco wyższy w grupie najstarszych seniorów, który wynosił odpowiednio: $0,19 \pm 0,04\%$ u młodych, $0,24 \pm 0,05\%$ u seniorów poniżej 85 r.ż. i $0,37 \pm 0,06\%$ u seniorów powyżej 85 r.ż. Ekspresja TNF zwiększała się istotnie dopiero po stymulacji PMA z jonomycyną, tzn. u młodych 11-krotnie, a w obu grupach seniorów 4-krotnie w porównaniu z poziomem komórek niestymulowanych. Podobny wzór ekspresji TNF obserwowano w analizie MFI.

Ekspresja IFN- γ w komórkach NK we wszystkich grupach wiekowych wzrastała po stymulacji IL-2 i PMA z jonomycyną w porównaniu z poziomem komórek niestymulowanych, który wynosił: $1,47 \pm 0,13\%$ u młodych, $2,74 \pm 0,7\%$ u seniorów poniżej 85 r.ż. i $4,5 \pm 0,95\%$ u najstarszych seniorów. W populacji osób młodych ekspresja IFN- γ zwiększała się 6-krotnie po stymulacji PMA z jonomycyną, natomiast w grupie seniorów poniżej 85 r.ż. 1,5-krotnie po

stymulacji IL-2 i 12-krotnie po stymulacji PMA z jonomycyną. W grupie najstarszych seniorów był to wzrost 1,33-krotny po stymulacji IL-2 i prawie 5-krotny po stymulacji PMA z jonomycyną. Analiza MFI potwierdziła te wyniki, ukazując dodatkowo w populacji osób młodych wrażliwość komórek NK na stymulację IL-2.

W pracy wykazano występowanie szeregu korelacji pomiędzy poziomem ekspresji białek ochronnych i cytokin prozapalnych w komórkach NK badanej populacji. Ekspresja SIRT1 przedstawiała bardzo wysoką dodatnią korelację z ekspresją HSP70^{intr} oraz szereg niższych dodatnich korelacji z TNF, IFN- γ , SOD2 i HSP70^{surf} w różnych warunkach stymulacji. Podobne korelacje wykazywała ekspresja HSP70^{intr}. Natomiast, ekspresja HSP70^{surf} korelowała pozytywnie z SOD2, TNF i IFN- γ w różnych warunkach doświadczalnych, z kolei ekspresja TNF korelowała z SOD2 i IFN- γ w wybranych warunkach stymulacji. Niską dodatnią korelację obserwowano także pomiędzy ekspresją IFN- γ i SOD2 w komórkach stymulowanych LPS. Ponadto ekspresja TNF wykazywała dodatnią korelację z wiekiem we wszystkich wariantach stymulacji, podobnie do SIRT1 i HSP70^{intr}, które przejawiały taką korelację we wszystkich warunkach doświadczalnych poza komórkami stymulowanymi IL-2.

Następnie oznaczono poziom stresu oksydacyjnego wyrażony stężeniem grup karbonylowych i 8-izoprostanów w lizatach komórkowych limfocytów NK hodowanych 48 godz. w warunkach kontrolnych (bez stymulacji) i po stymulacji za pomocą IL-2, LPS i PMA z jonomycyną. Najwyższe stężenie grup karbonylowych zaobserwowano u osób młodych (przedział od $0,49 \pm 0,03$ nM/mg do $0,53 \pm 0,04$ nM/mg). Było ono istotnie wyższe w porównaniu z seniorami poniżej 85 r.ż. (przedział od $0,33 \pm 0,04$ nM/mg do $0,34 \pm 0,03$ nM/mg, oprócz komórek niestymulowanych) i seniorami powyżej 85 r.ż. (przedział od $0,28 \pm 0,04$ nM/mg do $0,33 \pm 0,06$ nM/mg). Analiza prób zależnych, tzn. stymulowanych względem niestymulowanych wykazała, że stymulacja komórek NK nie wpływała na stężenie grup karbonylowych w badanych grupach wiekowych i tym samym na poziom stresu oksydacyjnego w tych komórkach.

Podobne wyniki uzyskano również podczas analizy stężeń 8-izoprostanów w ekstraktach komórek NK. Najwyższe stężenie 8-izoprostanów zaobserwowano u osób młodych w większości analizowanych próbek (przedział od $70,00 \pm 5,77$ pg/mL do $83,85 \pm 6,86$ pg/mL). Było ono istotnie wyższe w porównaniu z populacją najstarszych seniorów (przedział od $48,48 \pm 3,86$ do $54,36 \pm 3,5$, oprócz komórek stymulowanych LPS). Jednak nie zauważono istotnych różnic w stężeniu 8-izoprostanów pomiędzy osobami młodymi i seniorami < 85 oraz pomiędzy seniorami < 85 i seniorami > 85 (oprócz komórek NK stymulowanych PMA z jonomycyną w grupie seniorów). Analiza prób zależnych, tzn. stymulowanych względem niestymulowanych wykazała, że proces aktywacji komórek NK nie wpływał na poziom stresu

oksydacyjnego wyrażony stężeniem 8-izoprostanów w komórkach NK badanych grup wiekowych. Jedyna istotna różnica była widoczna pomiędzy niestymulowanymi i stymulowanymi za pomocą LPS komórkami NK w grupie osób młodych.

Zauważono także ujemne korelacje pomiędzy stężeniem grup karbonylowych a ekspresją SOD2, HSP70^{intr} i IFN- γ oraz pomiędzy stężeniem 8-izoprostanów a ekspresją SIRT1, HSP70^{intr} i TNF w różnych warunkach doświadczalnych. Stężenia grup karbonylowych i 8-izoprostanów w ekstraktach komórek NK wykazywały ujemną korelację z wiekiem w komórkach niestymulowanych i we wszystkich wariantach stymulacji oprócz stymulowanych LPS w przypadku 8-izoprostanów.

Podsumowanie

Przedstawione w pracy wyniki dostarczają nowej wiedzy na temat roli komórek NK w procesie starzenia. Wykazano, że populacja najstarszych seniorów wykształciła dobrze rozwiniętą odpowiedź adaptacyjną na stres w komórkach NK ze stałym, podwyższonym poziomem ekspresji białek ochronnych, tzn. SIRT1 i HSP70^{intr}. Komórki były odporne na stymulację i wykazywały bardzo wysoką dodatnią korelację pomiędzy ekspresją obu białek ochronnych zarówno w komórkach niestymulowanych jak i poddanych stymulacji. W odpowiedzi na stres komórkowy manganowa dysmutaza ponadtlenkowa wydaje się natomiast odgrywać inną rolę w porównaniu z białkami SIRT1 i HSP70, ponieważ w niestymulowanych komórkach NK jej poziom ekspresji jest stosunkowo niski. W przypadku tego białka zostaje natomiast zachowana zwiększająca się z wiekiem wrażliwość na proces stymulacji, która utrzymuje się do bardzo zaawansowanego wieku. Specyficzny wzór ekspresji białek ochronnych w limfocytach NK może także wpływać na proces rozwijania się zjawiska długowieczności.

Publikacja 4

Lucyna Kaszubowska, Jerzy Foerster, Daria Schetz, Zbigniew Kmieć. *CD56bright cells respond to stimulation until very advanced age revealing increased expression of cellular protective proteins SIRT1, HSP70 and SOD2*. Immun. Ageing 2018, 15:31. IF 4.019; MNiSW 25.

Czwarta praca dotyczyła zmian zachodzących w procesie starzenia w ekspresji komórkowych białek ochronnych w subpopulacjach limfocytów NK: komórkach CD56dim i CD56bright. Miała na celu ocenę ekspresji sirtuiny 1 (SIRT1), białek szoku termicznego

Hsp70 (HSP70) i manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2) w stymulowanych komórkach subpopulacji limfocytów NK osób młodych (średnia wieku 21 lat), seniorów poniżej 85 roku życia (średnia wieku 76 lat) i seniorów powyżej 85 roku życia (średnia wieku 88 lat). Komórki były stymulowane IL-2, LPS i PMA z jonomycyną, a poziom ekspresji białek ochronnych był porównywany z komórkami niestymulowanymi, hodowanymi przez 48 godz. Oceniano również ekspresję cytokin prozapalnych zarówno w stymulowanych jak i niestymulowanych komórkach CD56dim i CD56bright oraz analizowano zależności występujące pomiędzy ekspresją poszczególnych rodzajów białek ochronnych oraz cytokin prozapalnych w obu subpopulacjach komórek.

Analiza cytometryczna wykonana zarówno metodą analizy odsetka komórek pozytywnych jak i MFI wykazała, że w grupie osób młodych i seniorów poniżej 85 r.ż. ekspresja SIRT1 zachodziła na niskim poziomie w niestymulowanych komórkach CD56dim i CD56bright. Obie populacje były jednak wrażliwe na stymulację za pomocą IL-2 i PMA z jonomycyną, co było widoczne zwłaszcza w grupie osób młodych w obu rodzajach analizy cytometrycznej. W przypadku seniorów < 85 większą wrażliwość na proces aktywacji wykazywały komórki CD56bright reagując na stymulację za pomocą wszystkich rodzajów czynników stymulujących, co pokazała przeprowadzona analiza MFI. Porównanie ekspresji SIRT1 w podobnie hodowanych i stymulowanych komórkach CD56dim i CD56bright pokazało, że to więcej komórek CD56bright wykazuje jej ekspresję zarówno w komórkach niestymulowanych jak i po stymulacji w grupie osób młodych i seniorów < 85. Ekspresja SIRT1 w grupie najstarszych seniorów zachodziła na istotnie wyższym poziomie zarówno w niestymulowanych jak i stymulowanych komórkach CD56dim i CD56bright w porównaniu z grupą osób młodych i seniorów < 85. W analizie odsetka komórek SIRT1-pozytywnych nie zaobserwowano zmian w ekspresji SIRT1 pomiędzy komórkami niestymulowanymi i stymulowanymi zarówno w obrębie populacji CD56dim jak i CD56bright. Natomiast analiza MFI pokazała, że komórki CD56bright najstarszych seniorów wykazywały wrażliwość na stymulację za pomocą IL-2 i PMA z jonomycyną, czego nie można było zaobserwować w tej grupie wiekowej w przypadku komórek CD56dim.

Wzór ekspresji wewnątrzkomórkowych białek HSP70 (HSP70^{intr}) w komórkach CD56dim i CD56bright przypominał ekspresję SIRT1. W grupie osób młodych i seniorów poniżej 85 r.ż. ekspresja tego białka w komórkach niestymulowanych zachodziła na niskim poziomie, ale obie subpopulacje komórek NK były wrażliwe na stymulację IL-2 i PMA z jonomycyną. Chociaż zarówno stymulowane komórki CD56dim jak i CD56bright wykazywały wzrost ekspresji HSP70^{intr}, to porównanie podobnie stymulowanych komórek wskazywało na wyższą ekspresję tego białka w komórkach CD56bright, zarówno w grupie osób młodych jak

i seniorów < 85 i widoczne było w obu rodzajach analizy (odsetek pozytywnych komórek i MFI). Niestymulowane komórki obu subpopulacji limfocytów NK w grupie najstarszych seniorów wykazywały istotnie wyższą ekspresję HSP70 w porównaniu z grupą osób młodych i seniorów < 85. Nie wykryto istotnych statystycznie różnic w ekspresji tego białka w niestymulowanych i stymulowanych komórkach CD56dim i CD56bright w analizie odsetka komórek pozytywnych z wyjątkiem komórek CD56bright stymulowanych PMA z jonomycyną. Analiza MFI z kolei wykazała podwyższony poziom ekspresji HSP70^{intr} zarówno w komórkach CD56dim jak i CD56bright stymulowanych PMA z jonomycyną i dodatkowo CD56bright stymulowanych IL-2.

Wzory ekspresji białek ochronnych SIRT1 i HSP70^{intr} były do siebie podobne i odpowiadały wynikom uzyskanym wcześniej dla całej populacji komórek NK, tzn. w niestymulowanych komórkach zarówno CD56dim jak i CD56bright zauważono podwyższony poziom ekspresji tych białek w grupie najstarszych seniorów. W tej grupie wiekowej komórki CD56dim okazały się niewrażliwe (SIRT1) lub prawie niewrażliwe (HSP70^{intr}) na aktywację w przeciwieństwie do komórek CD56bright odpowiadających na stymulację IL-2 i PMA z jonomycyną. Nasze wyniki wskazują, że bardziej wrażliwe na stymulację komórki CD56bright mogą być zaangażowane w bardziej indukowalną formę odpowiedzi na stres, utrzymwaną w komórkach do bardzo zaawansowanego wieku razem z podwyższonym poziomem białek ochronnych. Bardziej liczne komórki CD56dim, wykazujące podwyższony poziom ekspresji białek ochronnych, ale niewrażliwe na stymulację wydają się przestaniać aktywność bardziej wrażliwych na stymulację, ale nielicznych komórek CD56bright w całkowitej populacji komórek NK.

Wzór ekspresji dla powierzchniowych białek HSP70 różnił się bardzo od tego opisanego dla wewnątrzkomórkowych białek HSP70. Komórki CD56dim niestymulowane wykazywały niską ekspresję białka HSP70, natomiast po stymulacji PMA z jonomycyną jego poziom wzrastał istotnie we wszystkich grupach wiekowych. Największą wrażliwość na stymulację wykazywały komórki CD56dim najstarszych seniorów, odpowiadając dodatkowo na działanie IL-2. Komórki CD56bright wydawały się jeszcze bardziej wrażliwe na proces aktywacji, ponieważ odpowiadały na stymulację wszystkich trzech rodzajów czynników stymulujących w grupie osób młodych i najstarszych seniorów, natomiast w grupie seniorów < 85 na wszystkie poza LPS, co wykazała analiza MFI. Kiedy porównywano ekspresję HSP70^{surf} pomiędzy podobnie traktowanymi komórkami CD56dim i CD56bright, to w większości przypadków była ona większa w komórkach CD56dim we wszystkich grupach wiekowych i obu rodzajach analizy (odsetek komórek pozytywnych i MFI). Zewnątrzkomórkowe białka HSP70 uznawane były za cząsteczki sygnalizacyjne aktywujące układ immunologiczny

poprzez stymulację syntezy cytokin prozapalnych [56], chociaż późniejsze prace wskazywały już raczej na ich przeciwzapalny charakter [57]. Nie sprawdzaliśmy, czy wykrywane na powierzchni białka HSP70 stanowiły formę błonową czy były zewnątrzkomórkową formą HSP70 związaną z powierzchnią komórek poprzez receptory TLR. Stosowaliśmy komercyjnie dostępne przeciwciała, które wykrywały raczej formę zewnątrzkomórkową wg wcześniejszych doniesień zespołu Profesor Multhoff [55]. Jednak niezależnie od ich pochodzenia, ekspresja białek HSP70^{surf} w naszych badaniach zachodziła na wielokrotnie niższym poziomie w porównaniu z wewnątrzkomórkowymi białkami HSP70, co odpowiadało także niskiej ekspresji cytokin prozapalnych, jaką obserwowano w niestymulowanych, hodowanych 48 godz. komórkach CD56dim i CD56bright. Podobnie w naszych wcześniejszych badaniach dotyczących analizy komórek CD56dim i CD56bright w próbkach krwi obwodowej wkrótce po pobraniu ekspresja HSP70^{surf} zachodziła na niskim poziomie. Świadczyło to o tym, że układ immunologiczny nie był zaangażowany w reakcję zapalną w badanych grupach wiekowych, co potwierdzały również wyniki analizy stężenia CRP w surowicy tych osób [5].

Ekspresja SOD2 nie wykazywała różnic pomiędzy niestymulowanymi i stymulowanymi komórkami CD56dim w grupie osób młodych, po czym wrażliwość na stymulację rosła, tzn. w obu grupach seniorów komórki były wrażliwe na PMA z jonomycyną. Grupa najstarszych seniorów wykazywała największą wrażliwość na proces aktywacji i odpowiadała dodatkowo na stymulację IL-2. Komórki CD56bright również wykazywały wzrost wrażliwości na proces aktywacji wraz z wiekiem, ale w porównaniu z CD56dim zaczynały z wyższego poziomu wrażliwości, reagując u osób młodych na stymulację za pomocą IL-2 i PMA z jonomycyną, podobnie u seniorów < 85, natomiast komórki najstarszych seniorów odpowiadały na wszystkie zastosowane czynniki stymulujące, co potwierdzały oba rodzaje analizy cytometrycznej. Porównanie podobnie traktowanych komórek CD56dim i CD56bright wykazało wyższą ekspresję SOD2 w stymulowanych komórkach CD56bright.

Ekspresja TNF w niestymulowanych komórkach CD56dim i CD56bright była istotnie wyższa w komórkach najstarszych seniorów w porównaniu z osobami młodymi i seniorami < 85. Proces starzenia związany jest bowiem z podwyższonym poziomem CRP i cytokin prozapalnych nawet u zdrowych ludzi [58]. W stymulowanych komórkach CD56dim we wszystkich grupach wiekowych ekspresja TNF ulegała podwyższeniu tylko w komórkach aktywowanych PMA z jonomycyną, z wyjątkiem najstarszych seniorów, których komórki wykazywały jeszcze dodatkowo wrażliwość na stymulację IL-2 w analizie MFI. Ten sam rodzaj analizy w przypadku komórek CD56bright we wszystkich grupach wiekowych wykazał wrażliwość komórek zarówno na IL-2 jak i PMA z jonomycyną. Chociaż to komórki

CD56bright wydawały się bardziej wrażliwe na stymulację, porównanie podobnie traktowanych komórek CD56dim i CD56bright wykazało przewagę ekspresji TNF w komórkach CD56dim. Komórki CD56bright uważane są za główne źródło cytokin, natomiast komórki CD56dim zaangażowane są bardziej w reakcję cytotoksyczną [59]. Jednak w warunkach bezpośredniego oddziaływania z komórkami docelowymi, także komórki CD56dim stają się efektywnymi producentami cytokin prozapalnych (np. TNF i IFN- γ), przewyższając w tym komórki CD56bright [9].

Wzór ekspresji IFN- γ w komórkach CD56dim i CD56bright przypominał do pewnego stopnia ekspresję TNF, ale komórki we wszystkich grupach wiekowych wykazywały wrażliwość zarówno na IL-2 jak i PMA z jonomycyną. Było to widoczne zwłaszcza w analizie MFI, chociaż do pewnego stopnia odzwierciedlała to także analiza odsetka komórek pozytywnych. Najbardziej wrażliwe na stymulację okazały się komórki CD56bright najstarszych seniorów, które reagowały na wszystkie zastosowane czynniki stymulujące, co można było zaobserwować w analizie MFI. Porównanie ekspresji IFN- γ w podobnie traktowanych komórkach CD56dim i CD56bright wykazało, że u najstarszych seniorów w ekspresji tej cytokiny przeważały komórki CD56bright, natomiast u seniorów < 85 i osób młodych komórki CD56dim. Obserwacja, że komórki CD56bright zachowywały wrażliwość na stymulację do bardzo zaawansowanego wieku stanowiła uzupełnienie naszych wstępnych wyników dotyczących ekspresji IFN- γ u najstarszych seniorów opisanych w pierwszej publikacji z przedstawionego cyklu [60]. Komórki CD56bright w populacji komórek NK wykazują bardziej immunomodulatorowy charakter w porównaniu z komórkami CD56dim, przy czym ich liczba spada z wiekiem [61], co również wykazano w naszych wcześniejszych badaniach [5]. Zaobserwowane zjawisko może stanowić zatem mechanizm kompensujący w układzie immunologicznym, który zachowuje funkcję immunoregulatorową komórek NK podczas procesu starzenia.

Analiza cytometryczna badanych próbek wykazała szereg zależności pomiędzy badanymi parametrami. Najsilniejszą korelację dodatnią zaobserwowano pomiędzy ekspresją SIRT1 i HSP70^{intr} zarówno w niestymulowanych jak i stymulowanych komórkach CD56dim (przedział 0,93 < R < 0,97) i CD56bright (przedział 0,82 < R < 0,97). Średnią korelację dodatnią można było również zauważyć pomiędzy ekspresją SOD2 i HSP70^{surf} zarówno w przypadku niestymulowanych jak i stymulowanych komórek CD56dim (przedział 0,65 < R < 0,74) i CD56bright (przedział 0,58 < R < 0,88). Szereg dodatnich niskich lub średnich korelacji wykazano również pomiędzy ekspresją TNF i SIRT1, HSP70^{intr}, HSP70^{surf} zarówno w niestymulowanych jak i stymulowanych komórkach CD56dim i CD56bright oraz pomiędzy IFN- γ i SIRT1, HSP70^{intr}, TNF w niestymulowanych i stymulowanych głównie za pomocą IL-2

oraz LPS komórkach CD56dim i CD56bright, chociaż w przypadku komórek CD56dim ta liczba zależności była większa. Wysokie dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją SIRT1 i HSP70 wskazują na powiązania ścieżek sygnalizacyjnych badanych białek ochronnych. Wykazano bowiem, że SIRT1 aktywuje transkrypcję genów kodujących białka z rodziny HSP70 poprzez deacetylację czynnika transkrypcyjnego HSF1 (ang. heat shock factor) [62].

Niektóre z analizowanych parametrów korelowały również z wiekiem. Na przykład ekspresja SIRT1 wykazywała raczej niską lub średnią dodatnią korelację z wiekiem w przypadku większości analizowanych warunków doświadczalnych, poza komórkami stymulowanymi za pomocą IL-2 zarówno w przypadku komórek CD56dim jak i CD56bright. Podobne korelacje zaobserwowano dla HSP70^{intr} odnośnie komórek CD56bright, natomiast w komórkach CD56dim wykazano dodatnią korelację z wiekiem tylko w przypadku komórek niestymulowanych i stymulowanych LPS. W odniesieniu do komórek CD56bright zauważono również podobne do HSP70^{intr} dodatnie korelacje z HSP70^{surf}. Takich korelacji nie wykryto jednak dla komórek CD56dim, poza tymi, które stymulowano PMA z jonomycyną. Natomiast dla TNF zarówno dla komórek CD56dim jak i CD56bright wykazano dodatnie korelacje o wartościach niskich do średnich w przypadku komórek niestymulowanych i stymulowanych za pomocą wszystkich czynników stymulujących.

Podsumowanie

Wyniki uzyskane w przedstawionej pracy wykazały, że komórki NK CD56dim i CD56bright odgrywają inną rolę w procesie starzenia. Komórki CD56bright wydają się być zaangażowane w indukowalną odpowiedź na stres i mogą ulegać aktywacji aż do bardzo zaawansowanego wieku, zwiększając jednocześnie podstawowy poziom białek ochronnych SIRT1 i HSP70^{intr} w grupie najstarszych seniorów, podobnie do komórek CD56dim. Komórki CD56dim natomiast wykazują zarówno indukowalną odpowiedź na stres u osób młodych i seniorów poniżej 85 r.ż. jak i stałą odpowiedź adaptacyjną w grupie najstarszych seniorów, w wyniku której komórki charakteryzują się podwyższonym, niewrażliwym na stymulację poziomem białek ochronnych. Komórki NK najstarszych seniorów przystosowały się w ten sposób do warunków stresu, który może towarzyszyć procesowi starzenia układu immunologicznego, a ta adaptacja z kolei mogła przyczynić się do wykształcenia długowieczności, która charakteryzuje przedstawicieli tej grupy.

5. Literatura

1. Cording S, Medvedovic J, Aychek T, Eberl G. Innate lymphoid cells in defense, immunopathology

and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2016;17:755–7.

2. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology.* 2009;126:458–65.

3. Campos C, Pera A, Lopez-Fernandez I, Alonso C, Tarazona R, Solana R. Proinflammatory status influences NK cells subsets in the elderly. *Immunol. Lett.* 2014;162:298–302.

4. Cooper MA. Teach Your NK Cells Well. *Immunity.* 2016; 45: 229–31.

5. Kaszubowska L, Foerster J, Kaczor JJ, Schetz D, Ślebioda TJ, Kmiec Z. Expression of cellular protective proteins SIRT1, HSP70 and SOD2 correlates with age and is significantly higher in NK cells of the oldest seniors. *Immun. Ageing.* 2017;14:3.

6. Hazeldine J, Hampson P, Lord JM. Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Aging Cell.* 2012;11:751–9.

7. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011;331:44–9.

8. O'Sullivan TE, Sun JC, Lanier LL. Natural Killer Cell Memory. *Immunity.* 2015;43:634–45.

9. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010;115:2167–76.

10. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dimCD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN- on activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108:728–32.

11. Sitrin J, Ring A, Garcia KC, Benoist C, Mathis D. Regulatory T cells control NK cells in an insulinitic lesion by depriving them of IL-2. *J. Exp. Med.* 2013; 210:1153–65.

12. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, et al. The immune system in extreme longevity. *Exp. Gerontol.* 2008; 43: 61–5.

13. Fulop T, Dupuis G, Baehl S, Le Page A, Bourgade K, Frost E, et al. From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation. *Biogerontology.* 2016;17:147–57.

14. Solana R, Alonso MC, Peña J. Natural killer cells in healthy aging. *Exp. Gerontol.* 1999;34:435–43.

15. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 2007;128:92–105.

16. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:244–54.

17. Mariani E, Cornacchiola V, Polidori MC, Mangialasche F, Malavolta M, Cecchetti R, et al. Antioxidant enzyme activities in healthy old subjects: influence of age, gender and zinc status. *Biogerontology.* 2006;7:391–8.

18. Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic. Res.* 2006;40:495–505.

19. K. A. F, N. G, Maliekkal J. Oxidative stress in ageing. *Int. J. Res. Med. Sci.* 2017;5:4826.

20. De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des.* 2009;15:3003–26.

21. Hwang J, Yao H, Caito S, Sundar IK, Rahman I. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic. Biol. Med.* 2013;61:95–110.
22. Saunders LR, Verdin E. Stress Response and Aging. 2009;323:1021–2.
23. Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Horio Y. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. *PLoS One.* 2013;8:e73875.
24. Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 2011;21:103–15.
25. Hensen SMM, Heldens L, Van Genesen ST, Pruijn GJM, Lubsen NH. A delayed antioxidant response in heat-stressed cells expressing a non-DNA binding HSF1 mutant. *Cell Stress Chaperones.* 2013;18:455–73.
26. Östling P, Björk JK, Roos-Mattjus P, Mezger V, Sistonen L. Heat Shock Factor 2 (HSF2) Contributes to Inducible Expression of *hsp* Genes through Interplay with HSF1. *J. Biol. Chem.* 2007;282:7077–86.
27. Murshid A, Eguchi T, Calderwood SK. Stress proteins in aging and life span. *Int. J. Hyperth.* 2013;29:442–7.
28. Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging.* 2012; 4:3–12.
29. Passos JF, Saretzki G, von Zglinicki T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:7505–13.
30. Houben JMJ, Moonen HJJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic. Biol. Med.* 2008;44:235–46.
31. Kaszubowska L, Dettlaff-Pokora A, Hak L, Szarynska M, Ryba M, Mysliwska J, et al. Successful ageing of nonagenarians is related to the sensitivity of NK cells to activation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008;59.
32. Rowe JW, Kahn RL. Human aging: usual and successful. *Science.* 1987 2019;237:143–9.
33. Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Salvioli S, Grassilli E, Capri M, et al. Successful immunosenescence and the remodelling of immune responses with ageing. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996;11 Suppl 9:18–25.
34. Martinez de Toda I, De la Fuente M. The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. *Biogerontology.* 2015;16:709–21.
35. Ballou SP, Lozanski FB, Hodder S, Rzewnicki DL, Mion LC, Sipe JD, et al. Quantitative and qualitative alterations of acute-phase proteins in healthy elderly persons. *Age Ageing.* 1996;25:224–30.
36. Chidrawar SM, Khan N, Chan YL, Nayak L, Moss PA. Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing.* 2006;3:10.
37. Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell.* 2010; 9:527–35.
38. Gayoso I, Sanchez-Correa B, Campos C, Alonso C, Pera A, Casado JG, et al. Immunosenescence of human natural killer cells. *J Innate Immun.* 2011; 3:337–43.
39. Takahashi E, Kuranaga N, Satoh K, Habu Y, Shinomiya N, Asano T, et al. Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16- CD56bright NK Cells but also from CD16- CD56dim NK cells. *Scand. J. Immunol.* 2007;65:126–38.

40. Sitte N, Merker K, Grune T. Proteasome-dependent degradation of oxidized proteins in MRC-5 fibroblasts. *FEBS Lett.* 1998; 440:399–402.
41. Adams S, Green P, Claxton R, Simcox S, Williams M V, Walsh K, et al. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front Biosci.* 2001; 6:A17-24.
42. Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, Kahan A, Ekindjian OG, Borderie D. Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clin Chim Acta.* 2006;372:147–53.
43. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990; 87:9383–7.
44. Yu TK, Caudell EG, Smid C, Grimm EA. IL-2 activation of NK cells: involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway. *J. Immunol.* 2000;164:6244–51.
45. Mian MF, Lauzon NM, Andrews DW, Lichty BD, Ashkar AA. FimH can directly activate human and murine natural killer cells via TLR4. *Mol. Ther.* 2010;18:1379–88.
46. O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology.* 2006;117:1–10.
47. Chopra RK, Nagel JE, Chrest FJ, Immunology WHAC. Impaired phorbol ester and calcium ionophore induced proliferation of T cells from old humans. 1987;456–62.
48. Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 2014;25:138–45.
49. Elpek KG, Rubinstein MP, Bellemare-Pelletier A, Goldrath AW, Turley SJ. Mature natural killer cells with phenotypic and functional alterations accumulate upon sustained stimulation with IL-15/IL-15R α complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:21647–52.
50. Liu Z, Kharmate G, Patterson E, Khan MM. Role of H1 receptors in histamine-mediated up-regulation of STAT4 phosphorylation. *Int. Immunopharmacol.* 2006;6:485–93.
51. Wendt K, Wilk E, Buyny S, Buer J, Schmidt RE, Jacobs R. Gene and protein characteristics reflect functional diversity of CD56dim and CD56bright NK cells. *J. Leukoc. Biol.* 2006;80:1529–41.
52. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 2007;35:1147–50.
53. Kamiński MM, Röth D, Sass S, Sauer SW, Krammer PH, Gülow K. Manganese superoxide dismutase: A regulator of T cell activation-induced oxidative signaling and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1823:1041–52.
54. Kaszubowska L, Wierzbicki PM, Karsznia S, Damska M, Ślebioda TJ, Foerster J, et al. Optimal reference genes for qPCR in resting and activated human NK cells--Flow cytometric data correspond to qPCR gene expression analysis. *J. Immunol. Methods.* 2015;422:125–9.
55. Multhoff G, Hightower LE. Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress Chaperones.* 2011;16:251–5.
56. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 2002;277:15028–34.
57. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJC, Broere F, van der Zee R, Bonorino C, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front. Immunol.* 2012 ;3:95.
58. Ogawa K, Suzuki K, Okutsu M, Yamazaki K, Shinkai S. The association of elevated reactive

oxygen species levels from neutrophils with low-grade inflammation in the elderly. *Immun. Ageing*; 2008;5:13.

59. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112:461–9.

60. Kaszubowska L, Kaczor JJ, Hak L, Dettlaff-Pokora A, Szarynska M, Kmiec Z. Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly. *J. Physiol. Pharmacol.* 2011;62.

61. Solana R, Campos C, Pera A, Tarazona R. Shaping of NK cell subsets by aging. *Curr. Opin. Immunol.* 2014;29:56–61.

62. Westerheide SD, Anckar J, Jr SMS, Sistonen L, Morimoto RI. Stress-Inducible Regulation of Heat Shock Factor 1 by the Deacetylase SIRT1. *Science*. 2009;323:1063–6.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Szczegółowy wykaz pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych znajduje się w załączniku nr 2 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki)

Analiza bibliometryczna dorobku naukowego przedstawiona jest w załączniku nr 5 (analiza bibliometryczna wykonana przez Pracownię Bibliograficzną Biblioteki Głównej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)

Pozostałe prace naukowo-badawcze koncentrowały się na następujących zagadnieniach:

1. indukcja procesu apoptozy w komórkach nowotworowych
2. immunomodulacja komórek układu odpornościowego
3. mechanizmy procesu starzenia ze szczególnym uwzględnieniem komórek układu odpornościowego

6.1. Indukcja procesu apoptozy w komórkach nowotworowych

Prace nr 1 i 2 dotyczyły sygnałowania receptorów dla TNF oraz ich zaangażowania w inicjację procesu apoptozy i nawiązywały do zagadnień, którymi zajmowałam się podczas przygotowywania pracy doktorskiej. Natomiast prace 3 i 4 dotyczyły innych czynników biologicznych, które mogły wpływać na żywotność komórek oraz indukować proces apoptozy w komórkach nowotworowych.

1. **Lucyna Kaszubowska**, Hartmut Engelmann, Magdalena Gotartowska, Mariola Iliszko, Jacek Bigda. *Identification of two U937 cell sublines exhibiting different patterns of response to tumour necrosis factor*. Cytokine 2001; vol. 13, nr 6, s. 365-370.

Pierwsza praca z tej grupy dotyczyła identyfikacji dwóch odmian linii monocytarnej U937, które różniły się wrażliwością na działanie cytotoksyczne TNF. Linia oporna na cytotoksyczną aktywność TNF wykazywała wyższą ekspresję receptora TNFR55, głównego receptora zaangażowanego w odpowiedź cytotoksyczną. Natomiast linia wrażliwa na działanie cytotoksyczne TNF charakteryzowała się podwyższoną ekspresją receptora TNFR75, który może konkurować z TNFR55 o białka adaptorowe wspólne dla obu receptorów, n.p. TRAF2, białko wiążące się z aktywującą NF- κ B kinazą NIK. Pod kontrolą NF- κ B znajdują się m.in. inhibitory apoptozy białka cIAP1 i cIAP2, stąd sygnalizacja TRAF2 może wiązać się z uruchomieniem ścieżki antyapoptotycznej. Obie linie opisane w pracy zostały zaproponowane jako model do badań nad mechanizmami wrażliwości i oporności na cytotoksyczne działanie TNF.

2. Małgorzata M. Doszczak, **Lucyna Kaszubowska**, Arkadiusz Pierzchalski, Jacek Bigda. *Mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B przez czynnik martwicy nowotworu (TNF)*. Post. Biochem. 2002; t. 48, nr 1, s. 54-65

Druga praca z tej grupy była pracą poglądową opisującą sygnałowanie receptorów dla TNF oraz ich zaangażowanie w aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B.

3. Kamila Siedlecka-Kroplewska, Agnieszka Jóźwik, **Lucyna Kaszubowska**, Anna Kowalczyk, Wojciech Bogusławski. *Pterostilbene induces cell cycle arrest and apoptosis in MOLT4 human leukemia cells*. Folia Histochem. Cytobiol. 2012; vol. 50, nr 4, s. 574-580.

Trzecia praca nawiązywała do zagadnień związanych z zahamowaniem proliferacji oraz indukcji procesu apoptozy w komórkach ludzkiej linii białaczkowej MOLT4 traktowanych pterostilbenem. Pterostilben to naturalna fitoaleksyna występująca w winogronach i innych owocach wykazująca właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwgrzybicze i przeciwcukrzycowe. W komórkach linii MOLT4 traktowanych pterostilbenem dochodziło do zatrzymania fazy S, po wcześniejszej akumulacji komórek w fazie G0/G1, a następnie indukcji apoptozy, co przejawiało się tworzeniem szczytu sub-G1 widocznego w cytometrycznej analizie cyklu komórkowego, degradacją DNA z utworzeniem charakterystycznej drabinki apoptotycznej, a wcześniej aktywacją kaspazy 3 (efektorowej kaspazy procesu apoptozy) i obniżeniem potencjału błon mitochondrialnych. Uzyskane

wyniki wykazały możliwość zastosowania pterostilbenu jako dodatkowego czynnika chemoterapeutycznego w procesie leczenia białaczki.

4. Piotr M. Wierzbicki, Marzena Kogut-Wierzbicka, Jarosław Ruczynski, Kamila Siedlecka-Kroplewska, **Lucyna Kaszubowska**, Agnieszka Rybarczyk, Magdalena Alenowicz, Piotr Rekowski, Zbigniew Kmiec. *Protein and siRNA delivery by transportan and transportan 10 into colorectal cancer cell lines*. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2014, vol 52, nr 4, s 270-280.

W **czwartej** pracy analizowano kilka rodzajów peptydów wnikaających do komórki (ang. cell-penetrating peptides, CPPs): transportan (TP), jego krótszy analog transportan 10 (TP10) oraz ich biotynylowane pochodne pod kątem zdolności do przenoszenia różnych związków biologicznych do komórek linii CRC (ang. colorectal cancer cells): HT29 i HCT116. Badano ich wpływ na żywotność komórek i zdolność do transportu przez błonę komórkową na przykładzie streptawidyny sprzężonej z fluoresceiną oraz małego interferującego RNA (siRNA) dla genu SASH1. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że w zakresie zastosowanych stężeń badane CPPs nie wpływały na żywotność komórek i cykl komórkowy, a biotynylowane pochodne transportanu były zdolne do przenoszenia streptawidyny-FITC do komórek CRC, co wykazano z zastosowaniem cytometrii przepływowej i mikroskopii fluorescencyjnej. Transportan i jego pochodne były zdolne również do przenoszenia siRNA, co wykazano metodą qPCR obserwując obniżony poziom ekspresji mRNA dla tego genu.

6.2. Immunomodulacja komórek układu odpornościowego

1. Anna Liberek, Zbigniew Kmiec, Dorota Kartanowicz, Piotr M. Wierzbicki, Marcin Stanisławowski, **Lucyna Kaszubowska**, Grażyna Łuczak, Magdalena Góra-Gębka, Piotr Landowski, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Tomasz Liberek, Barbara Kamińska, Joanna Jakóbkiewicz-Banecka, Grzegorz Węgrzyn. *The mRNA level of the transforming growth factor β 1 gene, but not the amount of the gene product, can be considered as a potential prognostic parameter in inflammatory bowel diseases in children*. Int. J. Colorectal Dis. 2013; vol. 28, nr 2, s. 165-172.

Pierwsza praca z tej grupy koncentrowała się na roli stężenia transformującego czynnika wzrostu β 1 (TGF- β 1) w osoczu oraz poziomu białka i mRNA dla TGF- β 1 w błonie śluzowej jelita w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu klinicznego nieswoistych zapaleń jelit u dzieci (ang. inflammatory bowel disease, IBD). TGF- β 1 odgrywa istotną rolę w procesach proliferacji i różnicowania komórek. W układzie immunologicznym natomiast pełni funkcję immunosupresyjną zapobiegając rozwojowi chorób o podłożu autoimmunologicznym i

związanych z przewlekłym stanem zapalnym. Stężenie TGF- β 1 w osoczu było oznaczane metodą ELISA, natomiast poziom ekspresji w błonie śluzowej jelita mRNA i białka TGF- β 1 był oznaczany odpowiednio metodą qPCR i immunohistochemicznie – półilościowo (IHC). Badana grupa dzieci obejmowała 36 dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (ang. Crohn's disease, CD) i 68 dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (ang. Colitis ulcerosa, UC). Dodatkowo 42 dzieci stanowiło grupę kontrolną. Pacjenci chorzy na IBD wraz z podgrupami chorych na CD i UC nie wykazywali różnic w stężeniu TGF- β 1 w osoczu i poziomie ekspresji białka w tkankach niezależnie od stadium choroby w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast poziom ekspresji mRNA w tkankach był istotnie wyższy w okresie nawrotu choroby w porównaniu z okresem remisji lub grupą kontrolną. Na podstawie uzyskanych wyników można było stwierdzić, że to poziom ekspresji mRNA, a nie białka TGF- β 1 w błonie śluzowej jelita może mieć znaczenie prognostyczne u dzieci chorych na nieswoiste zapalenie jelit.

2. Anna Liberek, Zbigniew Kmieć, Piotr M. Wierzbicki, Joanna Jakóbkiewicz-Banecka, Tomasz Liberek, Grażyna Łuczak, Katarzyna Plata-Nazar, Magdalena Słomińska-Frączek, **Lucyna Kaszubowska**, Magdalena Gabig-Cimińska, Alicja Węgrzyn. *Transforming growth factor β 1 protein and mRNA levels in inflammatory bowel diseases: towards solving the contradictions by longitudinal assessment of the protein and mRNA amounts*. Acta Biochim. Pol. 2013; vol. 60, nr 4, s. 683-688

Druga praca dotycząca roli TGF- β 1 jako potencjalnego parametru prognostycznego w osoczu i tkankach jelita u dzieci chorych na nieswoiste zapalenie jelit (IBD) nawiązywała do pierwszej i miała na celu wyjaśnienie sprzeczności wynikających z braku istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniem TGF- β w osoczu i występującymi różnicami poziomu mRNA w błonie śluzowej jelita w zależności od stadium choroby. Badana grupa obejmowała 19 dzieci chorych na IBD, natomiast grupę kontrolną stanowiło 42 dzieci. Stężenie TGF- β 1 w osoczu było określane metodą ELISA, a poziom ekspresji mRNA w tkance jelita metodą qPCR. Wyniki analizy stężenia białka i poziomu mRNA dla TGF- β 1 w badaniach długoterminowych (ang. „longitudinal studies”) przeprowadzonych u tych samych pacjentów w różnych fazach choroby wykazały zarówno istotnie wyższe stężenie białka w osoczu jak i wyższy poziom ekspresji mRNA w tkance jelita u chorych na IBD w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, zarówno stężenie białka jak i poziom mRNA było wyższe u wszystkich pacjentów w aktywnej fazie choroby w porównaniu z fazą remisji. Dlatego to właśnie ocena poziomu ekspresji TGF- β 1 w badaniach długoterminowych prowadzonych dla poszczególnych pacjentów może pomóc w monitorowaniu przebiegu klinicznego choroby.

3. Maria Klatka, **Lucyna Kaszubowska**, Ewelina Grywalska, Magdalena Wasiak, Leszek Szewczyk, Jerzy Foerster, Marta Cyman, Jacek Rolinski. *Treatment of Graves' disease with methimazole in children alters the proliferation of Treg cells and CD3+ T lymphocytes*. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2014, vol 52, nr 1, s 69-77.

Trzecia praca z tej grupy miała na celu ocenę immunomodulującego wpływu metimazolu (MMI) na proces proliferacji komórek Treg i limfocytów CD3+ u dzieci chorych na chorobę Gravesa-Basedowa (ang. Graves' disease, GD). Wskaźniki proliferacji oznaczone metodą inkorporacji trytowanej tymidyny dla stymulowanych PMA (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate) i niestymulowanych limfocytów CD3+ przed podaniem MMI były istotnie wyższe w porównaniu do tych uzyskanych po podaniu MMI. Natomiast te same wskaźniki oznaczone w podobnie traktowanych komórkach Treg były istotnie niższe przed podaniem MMI w porównaniu do tych uzyskanych po jego podaniu. Zaobserwowano również wyższe wskaźniki proliferacji niestymulowanych i stymulowanych za pomocą PMA limfocytów Treg przed rozpoczęciem terapii MMI i po terapii u pacjentów, którzy nie mieli nawrotu nadczynności tarczycy w porównaniu z pacjentami z nawrotem. Dzieci cierpiące na chorobę Gravesa-Basedowa charakteryzował niższy potencjał proliferacyjny komórek Treg w porównaniu z limfocytami CD3+. Wspólne hodowle (kokultury) limfocytów T i komórek Treg pokazały, że limfocyty Treg nie były w stanie aktywnie hamować proliferacji w komórkach CD3+ u pacjentów cierpiących na chorobę Gravesa Basedowa. Uzyskane wyniki wykazały również, że podanie MMI redukowało aktywność proliferacyjną limfocytów T (CD3+) u dzieci chorych na GD i zwiększało potencjał proliferacyjny komórek Treg. Te ostatnie komórki wydają się częściowo dysfunkcyjne w chorobie GD i prawdopodobnie podlegają supresji przez limfocyty CD3+, a MMI przejawia względem nich efekt immunomodulujący.

6.3. Mechanizmy procesu starzenia ze szczególnym uwzględnieniem komórek układu odpornościowego

1. **Lucyna Kaszubowska**, Agnieszka Dettlaff-Pokora, Łukasz Hak, Magdalena Szaryńska, Monika Ryba, Jolanta Myśliwska, Andrzej Myśliwski. *Successful ageing of nonagenarians is related to the sensitivity of NK cells to activation*. J. Physiol. Pharmacol. 2008; vol. 59, suppl. 9, s. 187-199.

Pierwsza praca z tej grupy zapoczątkowywała cykl prac dotyczących roli komórek NK w procesie starzenia. Jej celem była ocena statusu czynnościowego komórek NK w grupie najstarszych seniorów (średni wiek 92 ± 2 lata), seniorów poniżej 85 r.ż (średni wiek 78 ± 5 lat) i w kontrolnej grupie osób młodych (średni wiek 25 ± 4 lata). Charakterystyka komórek

NK w poszczególnych grupach wiekowych opierała się na ocenie ich cytotoksyczności, ekspresji wewnątrzkomórkowego IFN- γ , długości telomerów i aktywności telomerazy w aktywowanych i nieaktywowanych komórkach. Uzyskane wyniki pokazały, że najstarsi seniorzy nie różnili się od innych grup wiekowych pod względem liczebności limfocytów NK i stopnia ich aktywności cytotoksycznej. Jednak komórki NK tej grupy wiekowej wykazywały najkrótsze telomery i najniższą aktywność telomerazy. Natomiast aktywowane za pomocą IL-2 limfocyty NK obu grup seniorów charakteryzowały się z kolei podwyższonym poziomem ekspresji IFN- γ oraz podwyższoną aktywnością telomerazy. Na podstawie uzyskanych wyników można było stwierdzić, że status aktywności komórek NK i ich stopień wrażliwości na proces aktywacji pozostaje dobrze zachowany do bardzo zaawansowanego wieku i może przyczyniać się do zdrowego procesu starzenia (ang. „healthy ageing”) i długowieczności.

2. Lucyna Kaszubowska. *Telomere shortening and ageing of the immune system.* J. Physiol. Pharmacol. 2008; vol. 59, suppl. 9, s. 169-186.

Druga praca z tej grupy była pracą poglądową opisującą zjawisko skracania telomerów podczas starzenia oraz czynniki, które wpływają na ten proces, np. czynniki genetyczne i epigenetyczne, hormony płciowe, reaktywne formy tlenu i proces zapalny. Długość telomerów jest zróżnicowana u człowieka, a proces skracania telomerów odbywa się ze zmiennym nasileniem w różnych populacjach komórek układu immunologicznego. Są to wyjątki w grupie komórek somatycznych, ponieważ po stymulacji mogą uaktywniać telomerazę, enzym zapobiegający skracaniu telomerów. Ma to ogromne znaczenie dla intensywnie proliferujących komórek znajdujących się w stanie aktywacji. Praca porusza również zagadnienia związane z procesem starzenia układu immunologicznego, który polega na jego przebudowie i prowadzi do większych zmian w zakresie odporności nabytej w porównaniu do stosunkowo dobrze zachowanej odporności wrodzonej.

3. Lucyna Kaszubowska, Tomasz Ślebioda, Jerzy Foerster, Zbigniew Kmieć. *Znaczenie komórek NK w procesie starzenia fizjologicznego.* Post. Biol. Kom. 2012; t. 39, nr 1, s. 123-137.

Trzecia w kolejności publikacja to praca poglądowa dotycząca roli komórek NK w procesie starzenia, która powstała częściowo w oparciu o własne wyniki doświadczeń, rozszerzona dodatkowo o zebraną na ten temat literaturę. Opisuje zmiany zachodzące w procesie starzenia na poziomie odporności nieswoistej oraz w składzie subpopulacji komórek NK. Porusza zagadnienia związane z wpływem procesu starzenia na ekspresję receptorów hamujących i aktywujących na powierzchni komórek NK, a także zmian w odpowiedzi tych

komórek na działanie cytokin. Nawiązuje również do zmian zachodzących wraz z wiekiem w długości telomerów i aktywności telomerazy w limfocytach NK. Wskazuje na obecność korelacji pomiędzy stanem zdrowia a liczbą i aktywnością tych komórek, a na końcu porusza zagadnienie znaczenia komórek NK w procesie „zdrowego starzenia” (ang. „healthy ageing”).

4. Tomasz Jerzy Ślebioda, **Lucyna Kaszubowska**, Zbigniew Kmieć. *Nowe mechanizmy aktywacji komórek NK w przebiegu infekcji wirusowych*. Post. Biol. Kom. 2012; t. 39, nr 1, s. 49-62.

Czwarta publikacja to praca poglądowa dotycząca mechanizmów aktywacji komórek NK w przebiegu infekcji wirusowych. Do niedawna uważano, że są one zaangażowane jedynie w odpowiedź nieswoistą, a ich aktywacja zależy od przypadkowego sygnałowania receptorów aktywujących i hamujących stymulowanych ligandami obecnymi na powierzchni komórek docelowych. Według najnowszych doniesień okazało się jednak, że ligandy dla receptorów aktywujących limfocytów NK mogą być produkowane także przez monocyty, makrofagi lub komórki dendrytyczne. Komórki NK wchodzi także w interakcje z komórkami dendrytycznymi i limfocytami T, wzajemnie regulując swoją aktywność. Wykazują także szereg cech charakterystycznych dla komórek pamięci immunologicznej, które zwykle uważane były za komórki typowe dla odporności nabytej. Praca przedstawia również wirusowe strategie ochronne skierowane przeciwko komórkom NK oraz udział limfocytów NK w mechanizmach obrony antywirusowej u myszy.

5. **Lucyna Kaszubowska**, Anna Piotrowska, Kamila Siedlecka-Kroplewska, Zbigniew Kmieć. *Komórki NKT jako element łączący odporność wrodzoną z odpornością nabytą*. Post. Biol. Kom. 2013; t. 40, nr 4, s. 697-724.

Piąta praca, również poglądowa, nawiązywała do komórek NKT, które są rodzajem limfocytów T wyposażonych w receptor TCR, ale również antygeny powierzchniowe charakterystyczne dla komórek NK. Rozpoznają antygeny lipidowe, pomijane przez inne limfocyty, które prezentowane są przez cząsteczkę CD1d. Limfocyty NKT funkcjonują jako element odporności nieswoistej posiadając zdolność natychmiastowej odpowiedzi na stymulację antygenem. Produkując szerokie spektrum cytokin, regulują rozwijającą się odpowiedź swoistą. Populację komórek NKT tworzy kilka subpopulacji limfocytów o odmiennych właściwościach efektorowych, które wyodrębniono na podstawie budowy receptora TCR oraz ekspresji receptora powierzchniowego CD161. Sposób aktywacji oraz lokalizacja wpływa na właściwości komórek NKT, które wykazują aktywność zarówno

prozapalną, jak i przeciwzapalną, co zaobserwowano w chorobach o podłożu autoimmunologicznym. Regulatorowy charakter tych komórek sprawia, że odgrywają one istotną rolę także w procesach starzenia i nowotworzenia, pełniąc wówczas w organizmie funkcję komórek o charakterze ochronnym.

6. Lucyna Kaszubowska, Piotr Mieczysław Wierzbicki, Sylwia Karsznia, Marta Damska, Tomasz Jerzy Ślebioda, Jerzy Foerster, Zbigniew Kmiec (2015). *Optimal reference genes for qPCR in resting and activated human NK cells: Flow cytometric data correspond to qPCR gene expression analysis*. J. Immunol. Methods 2015; vol. 422, s. 125-129

Szósta praca miała charakter metodyczny i opisywała wstępne doświadczenia związane z realizacją grantu NCN N N404 597640. Koncentrowała się na wyborze odpowiednich genów referencyjnych do analizy ekspresji genów wybranych białek ochronnych komórki metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real time PCR, qPCR lub quantitative PCR). W przypadku badań ilościowych konieczna jest normalizacja wyników pomiędzy analizowanymi próbkami. Wybór odpowiednich genów referencyjnych (normalizujących) jest wówczas kluczowy. Gen normalizator powinien charakteryzować się stałym, nieregulowanym poziomem ekspresji w danej tkance. Uważa się, że ten warunek spełniają geny metabolizmu podstawowego (ang. „housekeeping genes”, HKGs). Powszechnie stosowane geny referencyjne mogą różnić się jednak poziomem ekspresji w różnych tkankach i warunkach eksperymentalnych, przyczyniając się do uzyskiwania błędnych danych dotyczących ekspresji badanych genów. W przypadku aktywowanych limfocytów dobór genów referencyjnych jest szczególnie istotny, ponieważ podczas stymulacji tych komórek dochodzi do całkowitego przestawienia metabolizmu komórkowego. Stymulowane komórki zaczynają proliferować, różnicować się, produkować i wydzielać cytokiny, zmieniać ekspresję antygenów powierzchniowych. Wiele ścieżek sygnałowych zostaje włączonych i wiele genów ulega zmianom w ekspresji.

Celem pracy była ocena ekspresji 14 potencjalnych genów referencyjnych w niestymulowanych i stymulowanych w różnych przedziałach czasowych za pomocą IL-2 i TNF komórkach linii NK-92. Komórki tej linii wykazują charakterystykę ludzkich komórek NK i są często wykorzystywane do badań nad biologią tej populacji limfocytów. Wyniki były analizowane za pomocą programu RefFinder, który integruje 4 programy stosowane do analizy i porównywania ekspresji genów referencyjnych: Genorm, Normfinder, BestKeeper i Delta Ct. Według przeprowadzonej analizy do najbardziej stabilnych genów referencyjnych w przypadku stymulowanych komórek NK należały geny *B2M* (gen kodujący β 2-mikroglobulinę), *IPO-8* (gen kodujący importynę 8) i *GAPDH* (gen kodujący dehydrogenazę

aldehydu 3-fosfoglicerynowego), natomiast najmniej stabilnymi były geny *HPRT1* (gen kodujący fosforybozylotransferazę hipoksantynową), *PPIA* (gen kodujący cyklofilinę A) oraz *RPL-32* (gen kodujący rybosomalne białko L32). Proces normalizacji przeprowadzono na genie *SOD2* (gen kodujący manganową dysmutazę ponadtlenkową). Następnie porównano poziom ekspresji mRNA dla genu *SOD2* w komórkach NK-92 stymulowanych IL-2 (100 U/ml) stosując jako geny referencyjne dwa wskazane przez program RefFinder jako najbardziej stabilne, tzn. B2M i IPO-8 oraz dwa wskazane jako najmniej stabilne, tzn. PPIA i HPRT1. Interesujący okazał się fakt, że wzór ekspresji mRNA dla *SOD2* był podobny w przypadku pary stabilnych genów referencyjnych i zupełnie różny, chociaż podobny w obrębie pary najmniej stabilnych genów normalizujących. Po 2 godz. stymulacji za pomocą IL-2 ekspresja *SOD2* wzrastała ponad 2-krotnie, następnie zmniejszała się ponad 3-krotnie po 24godz. i nieznacznie wzrastała po 72 godz. ponad poziom charakterystyczny dla niestymulowanych komórek kontrolnych. Podobne wyniki uzyskano po zastosowaniu jako genu normalizującego zarówno B2M jak i IPO8, chociaż w tym ostatnim przypadku nie zaobserwowano istotności statystycznej w zachodzących zmianach poziomu ekspresji mRNA dla genu *SOD2*. Ciekawe było to, że przeprowadzona następnie analiza cytometryczna potwierdziła wyniki uzyskane metodą qPCR, ale tylko dla genów referencyjnych B2M i IPO-8. Było to znamienne również dlatego, że zmiany w ekspresji genów na poziomie mRNA często nie korelują ze zmianami na poziomie ekspresji białka. Wynika to ze wzajemnych oddziaływań różnych mechanizmów regulatorowych wpływających na proces ekspresji białka w komórce.

Niestety na początku realizacji grantu N N404 597640 nie udało się opracować skutecznej metody izolacji RNA z komórek NK izolowanych z krwi obwodowej, pomimo prób podejmowanych różnymi metodami z wykorzystaniem 10 różnych zestawów komercyjnych, które producenci rekomendowali do izolacji RNA z niewielkich ilości komórek. Z podobnej ilości komórek linii komórkowej NK-92 udawało się wyizolować RNA w przypadku kilku zestawów, natomiast próby uzyskania RNA z izolowanych komórek NK z krwi obwodowej kończyły się niepowodzeniem. Dlatego metodą z wyboru podczas realizacji projektu stała się cytometria przepływowa, dzięki której udało się oznaczyć zmiany w ekspresji badanych białek ochronnych komórki.

7. Sherif Mohamed Zaki, Enas Ahmed Mohamed, Shereen Abdel Fattah, Hend Abdullah, Lucyna Kaszubowska. *Age-associated functional morphology of thyroid and its impact on the expression of vimentin, cytokeratins and VEGF: the role of nigella in refinement.* Folia Histochemica et Cytobiologica, 2018, vol 56, nr 3, s 159-171

Siódma praca z tej grupy dotyczyła zmian zachodzących z wiekiem w strukturze i funkcji tarczycy w modelu szczurzym. Miała na celu wyjaśnienie zależności zachodzących w procesie starzenia pomiędzy poziomem markerów układu oksydacyjno / antyoksydacyjnego, ekspresją filamentów wimentynowych i cytokeratynowych uważanych za pośrednie wskaźniki uszkodzenia tkanki oraz poziomem ekspresji mRNA dla VEGF w tarczycy. Analizowano także rolę podawanego zwierzętom oleju z czarnuszki siewnej (*Nigella sativa*) w hamowaniu zmian zachodzących wraz z wiekiem w strukturze i funkcji tarczycy. W pracy oceniano stężenie malondialdehydu – MDA – markera stresu oksydacyjnego i glutationu – GSH – związku o charakterze antyoksydacyjnym oraz aktywności dysmutaz ponadtlenkowych – SOD – enzymów o charakterze antyoksydacyjnym. Ekspresja filamentów wimentynowych i cytokeratynowych była analizowana immunohistochemicznie, natomiast ekspresja mRNA VEGF metodą qPCR. Oceniano również zależności pomiędzy tymi parametrami a stężeniem hormonów tarczycy i TSH w surowicy. Badania prowadzono na 30 szczurach, które podzielono na następujące grupy: młode dorosłe kontrole (wiek: 7 miesięcy), młode dorosłe szczury, którym podawano olej z czarnuszki (wiek: 7 miesięcy), starsze dorosłe kontrole (wiek: 18 miesięcy), starsze dorosłe szczury, którym podawano olej z czarnuszki (wiek: 18 miesięcy) i stare szczury (wiek 22 miesiące).

Analiza morfologii pęcherzyków tarczycy wykazała, że pęcherzyki młodych szczurów były raczej małe lub średnich rozmiarów w przeciwieństwie do pęcherzyków starych szczurów, które posiadały nieregularny kształt, a wiele z nich było poszerzonych i wysłanych płaskimi komórkami. Istotne zahamowanie zmian zachodzących w morfologii pęcherzyków tarczycy wraz z wiekiem zauważono w grupie starszych dorosłych szczurów, którym podawano olej z czarnuszki. W grupie starszych dorosłych kontroli i starych szczurów wystąpił spadek stężenia hormonów tarczycy T3 i T4 i poziomu TSH w surowicy w porównaniu z młodymi szczurami. Obserwowano również dodatnią korelację pomiędzy ilością komórek pęcherzykowych i stężeniem hormonów T3 i T4 w surowicy. Proces starzenia charakteryzowało wyraźne przesunięcie równowagi oksydacyjno /antyoksydacyjnej w stronę stresu oksydacyjnego, co potwierdziły badania stężenia MDA, GSH i aktywności SOD w homogenatach tkankowych. Zauważono, że podawanie szczurom oleju z czarnuszki normalizowało te parametry. Analiza histomorfometryczna była przeprowadzona na skrawkach tarczycy, w których immunohistochemicznie wyznakowano filamenty wimentynowe i cytokeratynowe, natomiast włókna kolagenowe były wybarwione metodą Massona. W grupie starszych dorosłych kontroli i starych szczurów zaobserwowano powiększony obszar zajmowany przez włókna kolagenowe i zwiększoną immunoreaktywność filamentów wimentynowych i cytokeratynowych. Wzrastał również poziom ekspresji mRNA dla VEGF oznaczony metodą qPCR. Ponadto zmniejszała się

średnia ilość komórek pęcherzykowych. Natomiast podawanie oleju z czarnuszki starszym dorosłym szczurom przywracało te parametry do poziomu młodych dorosłych kontroli. Zatem antyoksydacyjne właściwości oleju z czarnuszki mogły przyczyniać się do obniżenia poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach tarczycy przyczyniając się w ten sposób do zahamowania zmian zachodzących tam wraz z wiekiem.

8. Lucyna Kaszubowska, Jerzy Foerster, Przemysław Kwiatkowski, Daria Schetz. *NKT-like cells reveal higher than T lymphocytes expression of cellular protective proteins HSP70 and SOD2 and comparably increased expression of SIRT1 in the oldest seniors*. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2018, vol 56, No.4, pp 231-240

Ostatnia praca z tej grupy rozszerzała zainteresowania badawcze o populację komórek CD3+CD56+ (ang. NKT-like cells). Komórki NKT-like należą do populacji limfocytów T (CD3+), które wykazują także ekspresję kilku receptorów charakterystycznych dla komórek NK: CD56, CD57, CD16, CD94, CD161. Są limfocytami efektorowymi zarówno odpowiedzi wrodzonej jak i nabytej oraz jednocześnie komórkami regulatorowymi odporności nabytej. Wykazują morfologię dużych ziarnistych limfocytów i uczestniczą w reakcji cytotoksycznej zarówno zależnej od MHC jak i niezależnej od MHC. Wydzielają wiele cytokin wpływających zarówno na odpowiedź Th1 jak i Th2. Stanowią 5-15% populacji limfocytów T krwi obwodowej.

Celem badań była ocena ekspresji białek zaangażowanych w odpowiedź komórki na stres: sirtuiny 1 (SIRT1), białek szoku termicznego Hsp70 (HSP70) i manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2) w populacji komórek NKT-like w porównaniu z limfocytami T w procesie starzenia.

Analiza cytometryczna wykazała, że ekspresja SIRT1 w limfocytach T (CD3+) była wielokrotnie wyższa w grupie najstarszych seniorów w porównaniu z limfocytami T seniorów poniżej 85 r.ż i osób młodych, podobnie zresztą do ekspresji SIRT1 w komórkach NKT-like (CD3+CD56+). Jednocześnie nie zauważono różnic istotnych statystycznie pomiędzy ekspresją SIRT1 w limfocytach T i NKT-like analizowanych w tej samej grupie wiekowej (młodych, seniorów < 85 i seniorów >85).

Ekspresja HSP70 w komórkach CD3+ najstarszych seniorów była również istotnie wyższa w porównaniu z komórkami w grupie seniorów poniżej 85 r.ż i osobami młodymi. Natomiast komórki CD3+CD56+ najstarszych seniorów wykazywały ekspresję tego białka na jeszcze wyższym poziomie w porównaniu z seniorami poniżej 85 r.ż. i osobami młodymi. Kiedy

porównano ekspresję HSP70 w komórkach CD3+ i CD3+56+ w badanych grupach wiekowych okazało się, że jest ona istotnie wyższa w komórkach CD3+56+ w porównaniu z komórkami CD3+, co wykazano w analizie MFI i częściowo analizie odsetka komórek pozytywnych.

Natomiast odsetek komórek wykazujących ekspresję SOD2 w populacji limfocytów T i NKT-like najstarszych seniorów był istotnie wyższy w porównaniu z odsetkiem takich limfocytów w grupie seniorów poniżej 85 r.ż., ale już nie w grupie osób młodych, co było widoczne w analizie MFI. Podobnie do HSP70, komórki CD3+CD56+ wykazywały istotnie wyższą ekspresję SOD2 w porównaniu z komórkami CD3+ kiedy porównywano je w obrębie tej samej grupy wiekowej w analizie MFI i częściowo analizie odsetka komórek pozytywnych.

Ekspresja SIRT1 i HSP70 korelowała pozytywnie z wiekiem zarówno w przypadku limfocytów T jak i NKT-like, natomiast ekspresja SOD2 korelowała dodatnio z wiekiem tylko w przypadku komórek NKT-like. Podwyższona ekspresja badanych białek ochronnych w obu badanych populacjach limfocytów wydaje się więc wykazywać związek ze zjawiskiem długowieczności oraz może wskazywać na rolę komórek NKT-like jako elementu łączącego odporność wrodzoną i nabytą w procesie starzenia układu immunologicznego, zwłaszcza w kontekście podwyższonej ekspresji białek SIRT1, HSP70 i SOD2, którą wcześniej obserwowano w komórkach NK najstarszych seniorów.

7. Kierowanie projektami badawczymi i udział w projektach

7.1. Granty KBN / NCN

Grant promotorski KBN 4PO5A02912 realizowany w latach 1997-2000 – główny wykonawca. Tytuł projektu: „*Wpływ receptorów czynnika martwicy nowotworu (TNF) na proces apoptozy w komórkach nowotworowych*”

Projekt badawczy własny – grant NCN – nr N N404 597640: realizowany w latach 2011-2015 – kierownik projektu. Tytuł projektu: „*Rola sirtuiny 1 i białek Hsp70 w modelowaniu stanu czynnościowego aktywowanych komórek NK ludzi w podeszłym wieku*”

7.2. Prace własne AMG / GUMed:

2002-2003 – „Ocena stopnia zaawansowania procesu starzenia replikacyjnego subpopulacji limfocytów ze szczególnym uwzględnieniem komórek NK w oparciu o analizę długości ich telomerów i aktywność telomerazy” (AMG, W-83, kierownik projektu).

2004-2007 – „Ocena zależności pomiędzy aktywnością czynników regulujących proces skracania telomerów, długością telomerów i aktywnością biologiczną komórek NK” (AMG, W-69, kierownik projektu).

2008-2010 – „Wpływ poziomu wrażliwości komórki na stres oksydacyjny w procesie starzenia układu immunologicznego na aktywność telomerazy i długość telomerów w komórkach NK” (GUMed, W-69, kierownik projektu)

8. Członkostwo i pełnione funkcje w towarzystwach naukowych:

- Polskie Towarzystwo Cytometrii – członek (1997-2000);
- Polski Oddział ETCS (European Tissue Culture Society) – członek (1999-2000)
- Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików (PTHC) – członek od 2000 r. i nadal
 - **2004 - 2010** – sekretarz Zarządu Głównego PTHiC
 - **2010 - 2016** – członek Zarządu Oddziału Gdańskiego PTHiC
 - **Od 2016** do nadal – zastępca Przewodniczącego Oddziału Gdańskiego PTHiC

9. Recenzje

Folia Biologica - 1 praca w 2012 r.

Folia Histochemica et Cytobiologica - 2 prace w 2014 r., 1 praca w 2017 r.

10. Organizacja zjazdów i sympozjów naukowych

10.1. udział w organizacji konferencji:

- XXXI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików (Gdańsk, 4-6.09.1996)
- 4-th Conference and Workshop of the Polish Society of Cytometry (18-21.10.1998; Gdańsk, Sopot)
- 13th International Students' Scientific Conference (12-14.05.2005; Gdańsk) – członek jury w sesji “Basic Sciences”

10.2. członkostwo w Komitecie organizacyjnym konferencji:

- EFIS 2000 Satellite Symposium (21-23.09.2000; Gdańsk & Sopot) – skarbnik
- XIII International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (23-27.08.2008) – członek komitetu organizacyjnego

11. Nagrody i wyróżnienia naukowe:

27.09.2000 – wyróżnienie na X Jubileuszowym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej (PTiDiK) w Poznaniu za plakat pt.: „Identyfikacja odmian linii U937 różniących się ekspresją receptorów dla TNF i podatnością na apoptozę indukowaną przez TNF” (Kaszubowska L., Bartczak M., Doszczak M., Gotartowska M., Engelmann H., Bigda J.)

11.12.2003 – Zespołowa Nagroda Naukowa Pierwszego Stopnia Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku za 2002 r. za cykl prac dotyczących analizy mechanizmu działania TNF i jego receptorów.

12. Współpraca z innymi jednostkami naukowymi

Prace opisane w punkcie 4 i 6 powstały we współpracy z następującymi jednostkami naukowymi:

12.1. Jednostki z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego:

- Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Medycznej - 2000-2001 - 1 publikacja
- Katedra i Zakład Biochemii GUMed – 2008-2011 - 2 publikacje
- Zakład Pielęgniarstwa Ogólnego – 2013 - 2 publikacje
- Zakład Toksykologii Klinicznej – 2017 – 1 publikacja
- Zakład Gerontologii Społecznej i Klinicznej GUMed – 2014-2018 - 7 publikacji
- Katedra i Zakład Farmakologii GUMed – 2018 - 3 publikacje
- Zakład Bioenergetyki i Fizjologii Wysiłku Fizycznego – 2018 – 1 publikacja

12.2. Jednostki spoza Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego:

- Institute for Immunology, Munich, Germany – 2001 - 1 publikacja

- Zakład Biochemii, Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku – 2011 – 1 publikacja
- Klinika Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie – 2014 - 1 publikacja
- Katedra Fizjoterapii, Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku – 2017– 1 publikacja
- Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, Cairo University, Cairo, Egypt – 2018 - 1 publikacja
- Katedra Histologii i Embriologii Człowieka, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie – 2018 -1 publikacja

13. Referaty na konferencjach tematycznych

1. **Lucyna Kaszubowska.** *Does telomere length contribute to the function of the ageing immune system?* 24th Congress of the Polish Physiological Society, Lublin, Poland, September 11-13, 2008.
2. **Lucyna Kaszubowska.** *Cytometryczne metody oznaczania apoptozy.* Cytometria przepływowa w immunologii. VI Spotkanie Sekcji Młodych Immunologów Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Gdańsk, 15-16 września 2000

14. Doniesienia zjazdowe:

1. Urszula Sulima, **Lucyna Krasieńska.** *Oczyszczanie endonukleazy restrykcyjnej TaqII* - II Konferencja Naukowa organizowana przez Katedrę Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk, 5-6.05.1994.
2. Urszula Sulima, **Lucyna Krasieńska**, Anna J. Podhajska . *The New Method of TaqII Restriction Endonuclease Purification and Its Preliminary Characterization* - III-rd International Students' Scientific Conference, Gdańsk, 10-14.05.1995.
3. Małgorzata Kozak, **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *Oba receptory dla czynnika martwicy nowotworu współpracują z interleukiną-1 w indukcji efektu cytotoksycznego* - V Spotkanie Sekcji Młodych Immunologów, Sobieszewo, 16-18.05.1996.
4. Małgorzata Kozak, **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *Both Tumor Necrosis Factor Receptors Synergize with Interleukin-1 in the Induction of Cytocidal Effect* - IV-th International Students' Scientific Conference, Gdańsk, 23-25.05.1996.
5. **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda, Tomasz Chodnik, Andrzej Myśliwski. *Identyfikacja apoptozy w komórkach CT6* - XXXI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików pt.: „Hormony, cytokiny i eikozanoidy”, Gdańsk, 4-6.09.1996.

6. Małgorzata Kozak, **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *Oba receptory dla czynnika martwicy nowotworu współpracują z interleukiną-1 w indukcji efektu cytotoksycznego* - XXXI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików pt.: „Hormony, cytokiny i eikozanoidy”, Gdańsk, 4-6.09.1996.
7. **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda, Tomasz Chodnik, Andrzej Myśliwski. *Identyfikacja apoptozy w komórkach CT6* - konferencja naukowa organizowana przez Ośrodek Nauki PAN w Poznaniu pt.: „Interakcje komórkowe in vitro”, Poznań, 26-27.09.1996.
8. Małgorzata Kozak, **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *Oba receptory dla czynnika martwicy nowotworu współpracują z interleukiną-1 w indukcji efektu cytotoksycznego* - konferencja naukowa organizowana przez Ośrodek Nauki PAN w Poznaniu pt.: „Interakcje komórkowe in vitro”, Poznań, 26-27.09.1996.
9. **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *Identification of apoptosis in CT6 and U937 cells* – III Konferencja Cytometrii Przepływowej organizowana przez Polskie Towarzystwo Cytometrii, Warszawa, 14-15.06.1997.
10. **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *Identyfikacja apoptozy w komórkach CT6 i U937*. Konferencja „Cytometria w diagnostyce lekarskiej”, Poznań, 24-26 września 1997
11. **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *Identyfikacja apoptozy w komórkach CT6 i U937* – Sympozjum Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej pt.: „Cytokiny w badaniach doświadczalnych i klinicznych”, Gdańsk, 16-18.10.1997.
12. **Lucyna Krasieńska**, Hartmut Engelmann, Jacek Bigda. *Identyfikacja dwóch odmian linii monocytarnej U937* – IX Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawa, 16-18.09.1998).
13. **L. Krasieńska**, H. Engelmann, J. Bigda. *In vitro model based on two types of monocytic cell line U937* – IV Konferencja Polskiego Towarzystwa Cytometrii pt.: „Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach naukowych i diagnostyce”, Gdańsk, 18-21.10.1998.
14. **Lucyna Krasieńska**, Hartmut Engelmann, Jacek Bigda. *Two lines of U937 cells exhibit different pattern of response to TNF* – VII Konferencja Biologii Komórkowej, Kraków, 9-11.09.1999.
15. Zuzanna Dobrzańska, **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *LPS can accelerate growth of hamster Bomirski Ab melanoma in vivo, but inhibits growth of Ab melanoma cells in vitro* - VII Konferencja Biologii Komórkowej, Kraków, 9-11.09.1999.
16. Małgorzata Doszczak, **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *Mechanism of interleukin-1 cytotoxicity in HeLa cells* - VII Konferencja Biologii Komórkowej (Kraków, 9-11.09.1999).
17. **Lucyna Krasieńska**, Hartmut Engelmann, Jacek Bigda. *Dwie odmiany linii monocytarnej U937 wykazują różny wzór odpowiedzi na czynnik martwicy nowotworu (TNF)* – I Krajowy Kongres Biotechnologii, Wrocław, 20-25.09.1999.
18. Zuzanna Dobrzańska, **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *LPS może przyspieszać wzrost chemicznego czerniaka Ab Bomirskiego in vivo, lecz hamuje wzrost komórek Ab in vitro* - I Krajowy Kongres Biotechnologii, Wrocław, 20-25.09.1999.

19. Małgorzata Doszczak, **Lucyna Krasieńska**, Jacek Bigda. *Mechanizm cytotoxycznosci interleukiny 1 w komorkach HeLa* - I Krajowy Kongres Biotechnologii, Wroclaw, 20-25.09.1999.
20. Jacek Bigda, **Lucyna Krasieńska**, Małgorzata Doszczak, Patrycja Koszałka, Zuzanna Dobrzańska. *In vitro and in vivo cancer models of TNF-induced apoptosis. Signal transduction pathways and regulation of gene expression as therapeutic targets*, Luxembourg, January 26th to 29th 2000.
21. **Lucyna Krasieńska**, Hartmut Engelmann, Jacek Bigda. *Two sublines of U937 cells exhibit different pattern of response to TNF*. 8th International TNF Congress, Trondheim, Norway, May 14-18, 2000.
22. **Lucyna Krasieńska**, Marta Bartczak, Magdalena Gotartowska, Hartmut Engelmann, Jacek Bigda. *Identification of sublines of U937 cells exhibiting different levels of TNF receptors and distinct patterns of receptor-mediated responses to TNF*. Third Joint Meeting of the ICS and ISICR, Amsterdam, November, 2000.
23. **Lucyna Kaszubowska**, Marta Bartczak, Małgorzata Doszczak, Magdalena Gotartowska, Hartmut Engelmann, Jacek Bigda. *Characterization of the U937 sublines exhibiting different levels of TNF receptors and distinct patterns of receptor-mediated responses to TNF*. EFIS 2000 : Satellite Symposium : Heat shock proteins: immune, stress response and apoptosis, Gdańsk, Sopot, September 21-23, 2000
24. **Lucyna Kaszubowska**, Magdalena Stolarek, Monika Młotkowska, Andrzej Myśliwski. *Analiza długości telomerów w komorkach NK w procesie starzenia układu immunologicznego*. XXXIX Sympozjum PTHC, Wroclaw, 18-20 września 2003
25. **Lucyna Kaszubowska**, Magdalena Stolarek, Monika Młotkowska, Andrzej Myśliwski. *Analiza długości telomerów w komorkach NK w procesie starzenia układu immunologicznego z zastosowaniem cytometrii przepływowej*. Cytometria w diagnostyce lekarskiej, Poznań, 2-3.06.2003.
26. Magdalena Stolarek, **Lucyna Kaszubowska**, Monika Młotkowska, Andrzej Myśliwski. *Flow cytometric analysis of telomere length in human NK cells*. 11th International Scientific Students' Conference for Students and Young Doctors, Gdańsk, Poland, 9-10 May, 2003.
27. **Lucyna Kaszubowska**, Magdalena Stolarek, Monika Ryba, Andrzej Myśliwski. *Wpływ długości telomerów na aktywność cytotoxyczną komórek NK w procesie starzenia układu immunologicznego*. XL Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików, Białystok, 16-18 wrzesień 2004
28. Andrzej Myśliwski, **Lucyna Kaszubowska**, Magdalena Stolarek. *The cytotoxic activity of human NK cells correlates with the length of their telomeres*. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montréal, Canada, July 18-23, 2004
29. Magdalena Stolarek, **Lucyna Kaszubowska**, Monika Ryba, Andrzej Myśliwski. *Analysis of telomere length and cytotoxic activity in human NK cells*. : 12th International Students' Scientific Conference for Students and Young Doctors, Gdańsk, Poland, 6-8 May 2004
30. Arkadiusz Pierzchalski, Karolina Banach, **Lucyna Kaszubowska**, Jacek Bigda. *Cooperation of TNF receptors is necessary for efficient response to tmTNF in U937 cells*.

10th International TNF Superfamily Conference, Lausanne, Switzerland, September 29-October 2, 2004.

31. **Lucyna Kaszubowska**, Łukasz Hak, Magdalena Stolarek, Monika Ryba, Andrzej Myśliwski. *Biological characterization of natural killer cells in the process of human immunosenescence*. IX Conference on Cell Biology. September 15-17, 2005, Łódź.
32. Monika Ryba, **Lucyna Kaszubowska**, Monika Młotkowska, Andrzej Myśliwski. *Estimation of telomerase activity level in human stimulated and non-stimulated NK cells*. 13th International Students' Scientific Conference for Students and Young Doctors, Gdańsk, 12-14.05.2005.
33. **Lucyna Kaszubowska**, Agnieszka Dettlaff-Pokora, Łukasz Hak, Magdalena Szaryńska, Monika Młotkowska, Monika Ryba, Agata Rogowska, Andrzej Myśliwski. *Ocena zależności pomiędzy długością telomerów, aktywnością telomerazy i aktywnością biologiczną komórek NK w procesie starzenia układu immunologicznego*. XLI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Stare Jabłonki, 14-15.09.2006.
34. Andrzej Myśliwski, **Lucyna Kaszubowska**, Agnieszka Dettlaff-Pokora, Magdalena Szaryńska, Jolanta Myśliwska. *Telomere length, telomerase activity and activity of NK cells of elderly are indicators of predisposition for longevity*. 10th Meeting of the Society for Natural Immunity, Cambridge 11-14 April 2007
35. **Lucyna Kaszubowska**, Agnieszka Dettlaff-Pokora, Jolanta Myśliwska, Andrzej Myśliwski. *IL-2 stimulates telomerase activity and reduces spontaneous apoptosis in human NK cells*. XIII International Congress of Histochemistry and Cytochemistry : ICHC2008 "Imaging of cell dynamics", Gdańsk, Poland, 23rd-27th August 2008
36. **Lucyna Kaszubowska**, Agnieszka Dettlaff-Pokora, Łukasz Hak, Magdalena Szaryńska, Monika Ryba, Jolanta Myśliwska, Andrzej Myśliwski. *Activation ability of NK cells seems to contribute to successful ageing of nonagenarians*. XIII Congress of Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Kraków, 14-17, May 2008.
37. **Lucyna Kaszubowska**, Jan J. Kaczor, Łukasz Hak, Magdalena Szaryńska, Zbigniew Kmiec. *The level of oxidative stress correlates with telomere length and sensitivity to activation of NK cells in the elderly*. XLIII Symposium of the Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry, Bydgoszcz, 21-23 September 2009
38. **Lucyna Kaszubowska**, Jan J. Kaczor, Łukasz Hak, Agnieszka Dettlaff-Pokora, Magdalena Szaryńska, Zbigniew Kmiec. *Stężenie cytokin prozapalnych w surowicy koreluje z długością telomerów i poziomem wrażliwości komórek NK na proces aktywacji*. 44 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Wojanów, 13-15 września 2010.
39. **Lucyna Kaszubowska**, Piotr Wierzbicki, Sylwia Karsznia, Zbigniew Kmiec. *Endogeneous controls for QPCR gene expression analysis in activated and non-activated human NK cells*. XLVII Symposium of the Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry : From labs to clinics : common aim, various techniques, with Satellite Symposium : Modulating the structure of the adipocyte in response to changes in energy balance, Olsztyn, 4-6 September, 2013.
40. Anna Liberek, Zbigniew Kmiec, Piotr M. Wierzbicki, Marcin Stanisławowski, **Lucyna Kaszubowska**, Grażyna Łuczak, Barbara Kamińska, Magdalena Góra-Gębka, Piotr Landowski, Joanna Jakóbkiewicz-Banecka, Małgorzata Grabska-Nadolska, Grzegorz Węgrzyn. *Rola transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) w etiopatogenezie i*

przebiegu klinicznym nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. VIII Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci, Warszawa, 22-24.05.2014.

15. Odbyte szkolenia i staże naukowe

15.1. Staże naukowe:

- 2-miesięczny staż naukowy w Instytucie Immunologii Uniwersytetu Ludwika Maksymiliana w Monachium, Niemcy (5.10.1997-29.11.1997) – nauka metody oznaczania aktywności czynników transkrypcyjnych EMSA (ang. electrophoretic mobility shift assay), doskonalenie metod analizy cytometrycznej, technik wykrywania apoptozy i wykonywania testów żywotności komórek. W wyniku nawiązanej współpracy powstała praca opublikowana w „Cytokine” (wymieniona w punkcie 6.1) i siedem plakatów przedstawionych na krajowych i zagranicznych konferencjach (wymienionych w punkcie 14). Plakat zaprezentowany na X Jubileuszowym Zjeździe PTIDiK w Poznaniu uzyskał wyróżnienie.

15.2. Szkolenia i warsztaty:

- “Confocal Imaging, Flow Cytometry and Image Analysis Course and Workshop” (10-13.06.1997, Kraków);
- “4-th Conference and Workshop of the Polish Society of Cytometry” (18-21.10.1998, Gdańsk, Sopot.);
- „Pierwsza Szkoła Letnia Komórek Macierzystych” (9.06.2004, Kraków);
- „Genomika i bioinformatyka” – warsztaty (29.06.-2.07.2005, Sucha Beskidzka)
- „Oznaczanie profilu ekspresji genów apoptotycznych” – warsztaty organizowane przez firmę Roche, 22.09.2009, Bydgoszcz
- Kurs metodyczny: „Real-Time PCR – analiza ekspresji genów” – Gdańsk, 1-2.09.2011
- warsztaty dotyczące mikrodysekcji laserowej organizowane przez Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olympus Polska, Molecular Machines and Industries – Laboratorium Diagnostyki Molekularnej, Wydział Biologii i Biotechnologii UWM (4.09.2013, Olsztyn)
- warsztaty „Akademia Merck Millipore – cytometria przepływowa” – Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny (Gdańsk, 26.05.2015)
- „Warsztaty mikroskopii wysokiej rozdzielczości” organizowane przez firmę Leica i KAWA.SKA, Zakład Anatomii i Neurobiologii, Collegium Biomedicum, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk 27-28.05.2015.
- „Badania ekspresji genów na różnych poziomach – optymalne zastosowanie reakcji qPCR i systemów genów reporterowych lucyferazy” - seminarium organizowane przez firmę Promega (20.05.2016, Gdańsk)

16. Działalność dydaktyczna:

- **1998-1999**
 - **Biologia komórki eukariotycznej** – ćwiczenia dla studentów III roku Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG
- **2000-2001**

- **Podstawy cytofizjologii z histofizjologią** – seminarya i ćwiczenia dla studentów I roku Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG

● **2002-2006**

- **Podstawy cytofizjologii z histofizjologią** – seminarya i ćwiczenia dla studentów dla studentów I r. Kierunku Lekarskiego i Oddziału Stomatologicznego Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Gdańsku

- **Histology with Embriology** – seminarya i ćwiczenia dla studentów dla studentów I r English Division Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Gdańsku

● **2007-2013**

Opiekun dydaktyczny przedmiotu Histologia z cytofizjologią na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego - udział w radach pedagogicznych.

- **Histologia z cytofizjologią** – seminarya i ćwiczenia dla studentów I r. Kierunku Lekarskiego Akademii Medycznej w Gdańsku / Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

- **Histology with Cell Physiology** – seminarya i ćwiczenia dla studentów dla studentów I r. English Division Wydziału Lekarskiego AMG / GUMed

- **Metody badań komórek i tkanek** – zajęcia fakultatywne dla studentów I r. Kierunku Lekarskiego AMG/GUMed

- **Wprowadzenie do biologii komórki nowotworowej** - zajęcia fakultatywne dla studentów II i III r. Kierunku Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

- **Introduction to Cancer Cytobiology** - zajęcia fakultatywne dla studentów II r, English Division Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

● **2013 – i nadal**

Udział w organizacji dydaktyki prowadzonej przez Katedrę i Zakład Histologii na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

- **Histologia z cytofizjologią** – seminarya i ćwiczenia dla studentów dla studentów I r. Kierunku Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytet Medycznego

- **Histology with Cell Physiology** – seminarya i ćwiczenia dla studentów dla studentów I r English Division Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

17. Opieka nad magistrantami

Pełniłam rolę opiekuna naukowego dla 3 magistrantów z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG, 3 magistrantów z Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego i 2 magistrantów z kierunku Analityka Medyczna z Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Lucyna Kaszubowska
25.02.2019